

**Experimentelle Untersuchung passiv-mechanischer Eigenschaften
der Hüftkapsel und umliegender Gewebe zur Entwicklung
biologischer Matrices für die Defektrekonstruktion des Hüftgelenks**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. rer. med.

an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von: Herrn M. Sc. Stefan Schleifenbaum
Geburtsdatum: 07.12.1986
Geburtsort: Ahlen

angefertigt an der: Klinik und Poliklinik für Orthopädie, Unfallchirurgie und plastische Chirurgie

Betreuer: Prof. Dr. med. Andreas Roth
PD Dr. med. Torsten Prietzel
Prof. Dr. med. Niels Hammer

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 21.08.2018

**Für meine Großeltern, Eltern
und Maren**

Inhaltsverzeichnis

I.	Abkürzungen	II
II.	Abbildungsverzeichnis	II
III.	Tabellenverzeichnis	II
1	Einleitung	1
2	Grundlagen	3
2.1	Anatomie des Hüftgelenks	3
2.1.1	Knöchernen Struktur	3
2.1.2	Labrum acetabuli, Hüftkapsel und Bandapparat	4
2.1.3	Muskulatur für die aktive Bewegung des Hüftgelenks	6
2.1.4	Bedeutung des labrokapsulären Komplexes für die Luxationsstabilität des Hüftgelenks	7
2.2	Hüftendoprothetik	8
2.2.1	Aufbau und Funktion einer Hüfttotalendoprothese	8
2.2.2	Bedeutung der Weichteilrekonstruktion nach endoprothetischer Versorgung des Hüftgelenks	10
2.3	Dezellularisierung	11
2.3.1	Aufbau des Bindegewebes	11
2.3.2	Einsatz dezellularisierter Gewebe	12
2.4	Methodisches Vorgehen	13
2.4.1	Prüfprotokoll für die mechanische Charakterisierung	13
2.4.2	Verfahren der Dezellularisierung	19
3	Publikationen	21
3.1	Tensile properties of the hip joint ligaments are largely variable and age-dependent – An in-vitro analysis investigating an age span between 14 and 93 years	21
3.2	Load and failure behavior of human muscle samples in the context of proximal femur replacement	29
3.3	Acellularization-Induced Changes in Tensile Properties Are Organ Specific - An In-Vitro Mechanical and Structural Analysis of Porcine Soft Tissues	37
4	Diskussion	62
5	Zusammenfassung der Arbeit	67
6	Literaturverzeichnis	69
IV.	Darstellung des eigenen Beitrags	77
V.	Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit	80
VI.	Lebenslauf und wissenschaftlicher Werdegang	81
VII.	Danksagung	88

I. Abkürzungen

CCD-Winkel	Caput-Collum-Diaphysen-Winkel
E-Modul	Elastizitätsmodul
Gew.	Gewicht
Lig.	Ligamentum
PEG	Polyethylenglykol

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Rechtes Hüftbein mit Blick in das Acetabulum [45].....	3
Abbildung 2: Rechtes proximales Femur von ventral [45]	4
Abbildung 3: A) Hüftgelenk mit Kapsel; B) Schnittdarstellung mit Kapsel und Labrum (entnommen und modifiziert nach Spalteholz 1939 [47]).....	5
Abbildung 4: Explosionsdarstellung einer schematisierten Hüfttotalendoprothese	8
Abbildung 5: A) CAD-Modell eines proximalen Femurersatzes mit Refixationslöchern; B) Foto eines Femurtotalersatzes mit Anbindungsschlauch	10
Abbildung 6: Ablaufplan für die Durchführung der mechanischen Testung	14
Abbildung 7: A) Entfettung und Entwässerung der freiliegenden Probenenden durch das Azetonbad; B) Eingebettete Probenenden nach der Vorbereitung für den Wasserangleich	15
Abbildung 8: Technische Zeichnung der Größenadaption für die Probengeometrie, angepasst an DIN 50125 [70]	16
Abbildung 9: A) Prozess des Abformens; B) Probennegativ mit Maßstab	17
Abbildung 10: A) Hysteresekurve der zyklischen Belastung; B) Auszug aus dem linken Diagramm zur Veranschaulichung der zyklischen Veränderungen.....	18
Abbildung 11: Arbeitsschritte bei der Dezellularisierung von Gewebe	20

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Für die aktive Bewegung des Hüftgelenks verantwortliche Muskulatur [44,47,49,50].....	6
Tabelle 2: Versuchsparameter für quasi-statische uniaxiale Zugversuche	19

1 Einleitung

Der zweibeinige aufrechte Gang des Menschen wird maßgeblich durch das Hüftgelenk unterstützt. Aufgrund des aufrechten Gangs wirken große Kräfte auf das Hüftgelenk [1–3], die in Abhängigkeit von der Phase des Gangzyklus das Körpergewicht übersteigen. Bei degenerativen Veränderungen oder Verletzungen des Hüftgelenks sind selbst alltägliche Bewegungen nur unter Schmerzen oder gar nicht möglich. Um eine angemessene Lebensqualität trotz derartiger Einschränkungen wiederherzustellen, hat sich die operative Versorgung der Hüfte mit künstlichen Gelenken etabliert [4]. Pro Jahr werden in Deutschland 219.000 primäre Hüftendoprothesen Implantationen [5], sowie ca. 22.000 Hüftendoprothesen Revisionen [5] durchgeführt. Diese Zahlen zeigen eine leicht ansteigende Tendenz, für die der demographische Wandel verantwortlich gemacht wird [6]. Aus den regelhaft hohen Erfolgsquoten resultiert eine hohe Erwartungshaltung der Patienten in Hinblick auf gute funktionelle Ergebnisse und einem komplikationslosen Verlauf des operativen Eingriffs. Trotz der hohen Erfolgsquoten können Komplikationen und unerwünschte Therapieverläufe nicht ausgeschlossen werden. Neben der sogenannten aseptischen Lockerung ist die Luxation die zweithäufigste Komplikation, die vor allem in der postoperativen Frühphase und somit noch während des Krankenhausaufenthaltes auftritt. Die Luxation stellt einen akuten Notfall dar, der in der Regel mit erheblichen Schmerzen und sofortiger Gehunfähigkeit des Patienten verbunden ist. Ziel jedes Operators und jeder Klinik ist es daher, die Luxationsraten nach endoprothetischer Versorgung so gering wie möglich zu halten. Publierte Luxationsraten in der Primärendoprothetik liegen zwischen 0,4 % und 5,0 % [7,8]. In der Revisionsendoprothetik treten Luxationsraten von 10 % und mehr auf [7,9–11]. Die Strategien zur Vermeidung der Luxation sind unter anderem die Schonung des Weichteilgewebes [12–15], die Rekonstruktion der im Rahmen der Endoprothesenimplantation eröffneten Hüftgelenkkapsel [16–20], sowie die chirurgische Rekonstruktion der umliegenden Weichteilgewebe [17,20,21].

Zur Weichteilrekonstruktion von Muskeln, Sehnen und Bändern nach Trauma werden vereinzelt auch dezellularisierte Gewebe eingesetzt [22–31], die maßgeblich aus extrazellulärer Matrix bestehen. Der Einsatz extrazellulärer Matrices bewirkt einen verbesserten Heilungsverlauf und ermöglicht die Biointegration [32–34]. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die durch das zellfreie Spendergewebe induzierte verminderte Antigenität, welche einer immunologischen Abstoßungsreaktion entgegenwirkt [35]. Aufgrund dieser Vorteile hat sich in der Kardiochirurgie der Einsatz von dezellularisiertem Gewebe bereits etabliert [22,36–38].

Durch den erfolgreichen Einsatz dezellularisierter Gewebe lässt sich die Fragestellung ableiten, inwiefern sich dieses Vorgehen für die Weichteilrekonstruktion auch im Bereich des Hüftgelenks eignet. In der vorliegenden Arbeit werden die passiv-mechanischen Eigenschaften der Hüftgelenksbänder sowie von Muskelrekonstruktionen nach tumorendoprothetischer Versorgung biomechanisch analysiert. Zusätzlich werden die mechanischen Eigenschaften von zellfreien Geweben untersucht, welche als ein mögliches Material für eine künstliche Hüftkapsel oder künstliche Muskelanbindungen dienen könnten. Die durchgeführten Testungen dienen hierbei als Pilotstudie, wodurch zunächst lediglich die unmittelbaren passiv-mechanischen Eigenschaften analysiert werden sollen. Es werden keine Aussagen bezüglich der Dauerbelastbarkeit oder aktiv gesteuerter Biomechanik getroffen. Auch Fragestellungen hinsichtlich Handhabung oder Toxizität des untersuchten Gewebes bzgl. möglicher Einsatzmöglichkeiten werden in diesen Studien nicht beantwortet.

2 Grundlagen

2.1 Anatomie des Hüftgelenks

Im folgenden Kapitel werden der Aufbau und die Struktur des menschlichen Hüftgelenks beschrieben. Das Hüftgelenk ist ein Nussgelenk und stellt damit eine Sonderform des Kugelgelenks dar [39–44]. Diese Sonderform wird durch die einzigartige knöcherne Struktur in Verbindung mit dem umgebenden Gewebe begründet [43].

2.1.1 Knöcherne Struktur

Der knöcherne Teil des Hüftgelenks setzt sich aus einem Teilbereich des Os coxae und des Femurs zusammen.

Das Acetabulum wird aus dem Os ischii im dorso-caudalen Randbereich und dem Os pubis im ventralen Randbereich gebildet. Das Os ilium bildet das Pfannendach. Die artikulierende Gelenkfläche ist die Facies lunata (siehe Abbildung 1). Sie weist eine C-Form auf, welche ihre breiteste Stelle im Bereich des Pfannendachs hat. Die Enden der Facies lunata sind durch die Incisura acetabuli unterbrochen, so dass der Limbus acetabuli keine vollständige Halbkugelform aufweist. Die Kugelform wird durch die Fossa acetabuli im Pfannengrund vervollständigt.

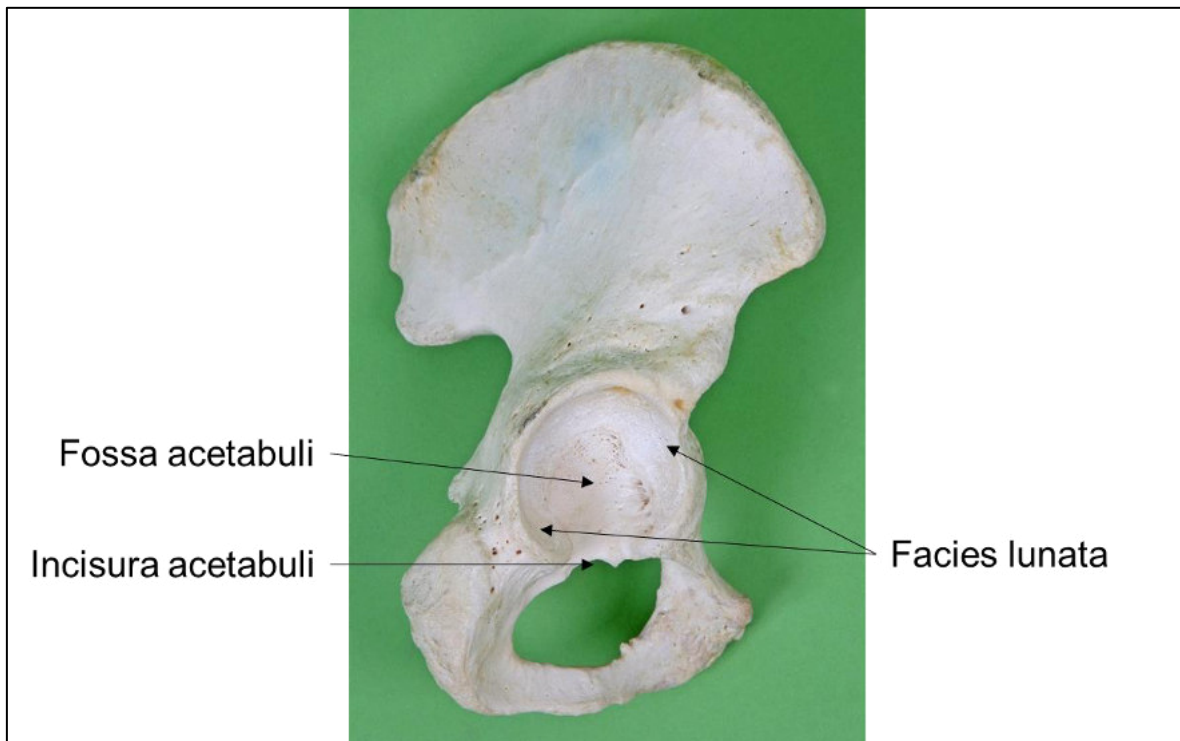


Abbildung 1: Rechtes Hüftbein mit Blick in das Acetabulum [45]

Den Gelenkpartner des Acetabulums bildet das kugelförmige Caput ossis femoris (Hüftkopf). Dieses ist ein Segment des Femurs, welches sich konzentrisch in das

Acetabulum einfügt. Im medialen Bereich des Hüftkopfes liegt die Fovea capitis femoris. Der Hüftkopf ist durch das Collum ossis femoris (Schenkelhals) mit dem Corpus ossis femoris verbunden (siehe Abbildung 2). Der Winkel zwischen Schenkelhals und Femurschaft wird als Caput-Collum-Diaphysen-Winkel (CCD-Winkel) bezeichnet. Bei Erwachsenen beträgt dieser Winkel zwischen 120 ° und 130 ° [43]. Zusätzlich weist der Schenkelhals eine Antetorsion von 12 ° bis 20 ° auf [43]. Im Bereich des Übergangs vom Schenkelhals zum Femurschaft liegen zudem der Trochanter major sowie der Trochanter minor, welche als Ansatzstellen für die Muskulatur dienen.

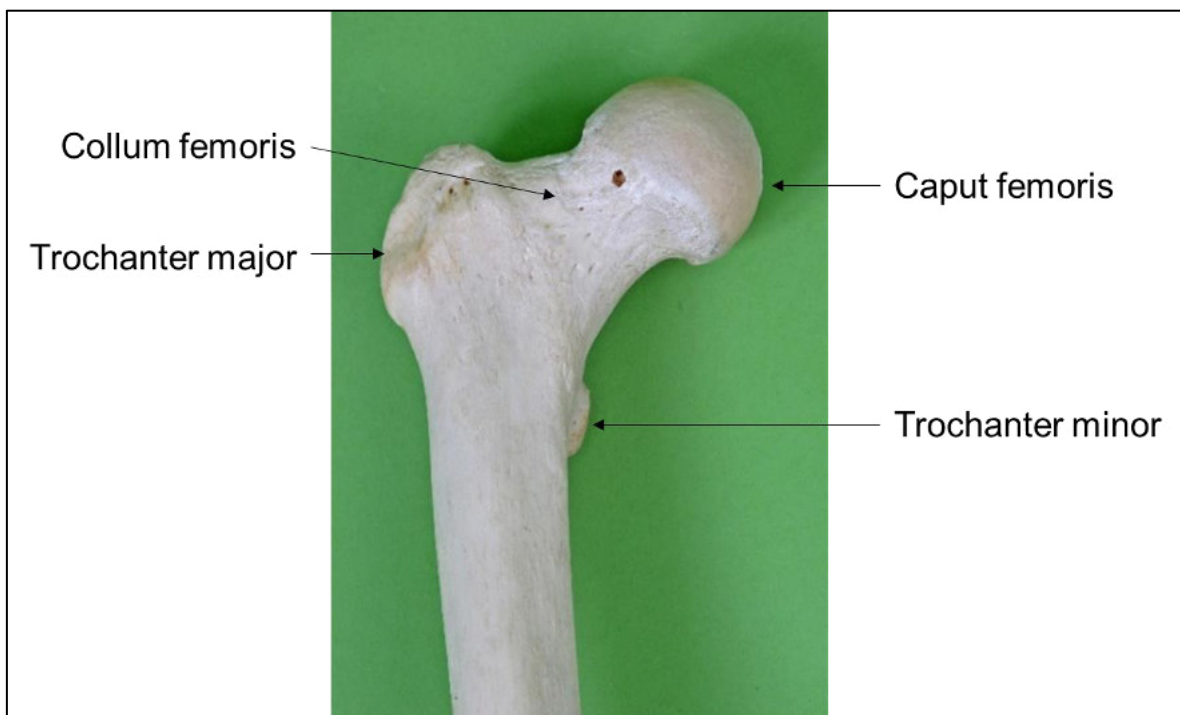


Abbildung 2: Rechtes proximales Femur von ventral [45]

2.1.2 Labrum acetabuli, Hüftkapsel und Bandapparat

Die Fossa acetabuli wird durch ein lockeres, fettreiches Bindegewebe (Pulvinar acetabulare) gefüllt und stellt so den Angleich an das Gelenkniveau zur Höhe der Gelenkfläche (Facies lunata) her. Die Facies lunata und der Limbus acetabuli werden im caudalen Bereich durch das Ligamentum (Lig.) transversum acetabuli geschlossen. Ein weiterer Teil der artikulierenden Gelenkfläche ist das Labrum acetabuli, welches über den Äquator des Hüftkopfes hinausragt (siehe Abbildung 3). Das Labrum setzt an dem Limbus acetabuli und am Ligamentum transversum acetabuli an und umgibt somit kreisförmig die Außenseite der Hüftpfanne. Das Labrum ist eine aus Faserknorpel bestehende dreieckige Gelenkklippe, die frei in der Gelenkhöhle zwischen Kapsel und knöcherner Struktur liegt. Sie

liegt eng am Hüftkopf an und hilft die hüftstabilisierende Wirkung des atmosphärischen Drucks zu gewährleisten [45,46].

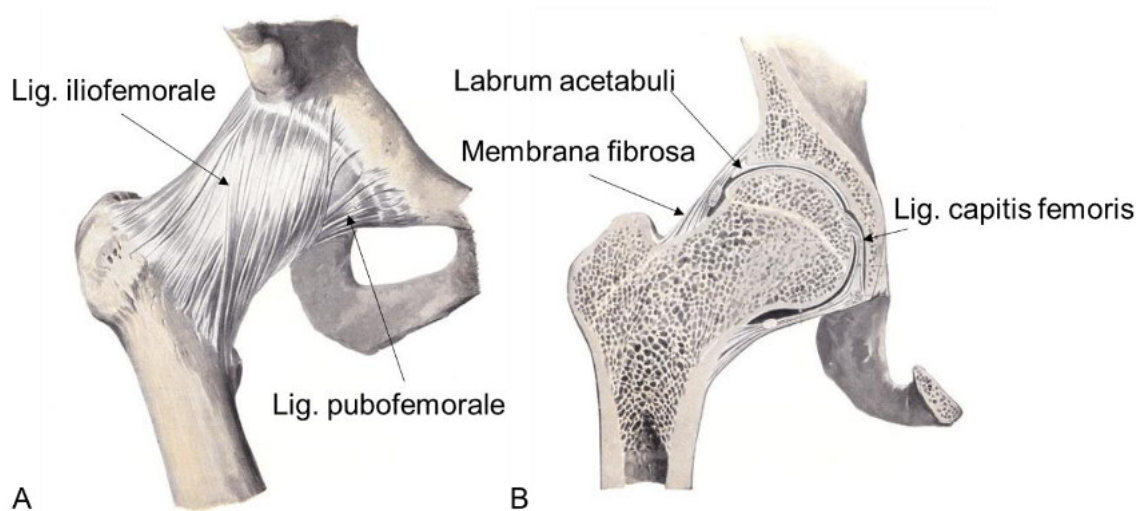


Abbildung 3: A) Hüftgelenk mit Kapsel; B) Schnittdarstellung mit Kapsel und Labrum (entnommen und modifiziert nach Spalteholz 1939 [47])

Das Gelenk wird durch die Hüftgelenkskapsel (Membrana fibrosa) hermetisch abgeschlossen. Der Ursprung der Kapsel liegt am knöchernen Rand des Acetabulum, am Lig. transversum acetabuli im Bereich des Incisura acetabuli sowie an der äußeren Basis des Labrum acetabulare [47]. Im Bereich des Femurs setzt die Kapsel an der Linea intertrochanterica sowie an der Crista intertrochanterica an. Intrakapsulär ist eine geringe Menge synovialer Flüssigkeit vorhanden [48], welche eine reibungsverminderte Bewegung des Femurs gegen das Acetabulum gewährleistet. Innerhalb des Hüftgelenks liegt das Lig. capitis femoris, welches eine zusätzliche Verbindung zum Lig. transversum acetabuli und zur Fovea capitis femoris bildet. Die Hüftkapsel wird von drei Bändern (Lig. iliofemorale, ischiofemorale und pubofemorale) umgeben und verstärkt. Diese verlaufen schraubenförmig vom Hüftgelenk zum Schenkelhals. Das Lig. iliofemorale entspringt der Spina iliaca anterior inferior und verläuft fächerförmig zum Linea intertrochanterica sowie zum Trochanter major. Es verhindert, dass das Becken über 10-15° überstreckt bzw. zurückkippen kann. Weiterhin grenzt es die Außenrotation und die Adduktion des Hüftgelenks ein. Das Lig. ischiofemorale hat seinen Ursprung am Corpus ossis ischii. Von hier aus verläuft es schraubenförmig dorsal sowie cranial um Caput und Collum femoris bis zum Ansatz der Linea intertrochanterica, Fossa trochanterica sowie Zona orbicularis. Durch seinen Verlauf festigt es die dorsale Kapselwand und schränkt die Innenrotation sowie die Streckung des Hüftgelenks ein. Das Lig. pubofemorale entspringt dem Ramus superior ossis pubis und setzt an der Zona orbicularis, Linea intertrochanterica und dem

Trochanter minor an. Die mediale Kapselwand wird durch dieses Band verstärkt. Weiterhin hemmt es die Außenrotation und die Abduktion [49].

2.1.3 Muskulatur für die aktive Bewegung des Hüftgelenks

Bewegungen des Hüftgelenks werden entlang der Hauptbewegungsachsen (transversale, sagittale und frontale Achse) vor allem durch die Muskulatur gewährleistet. Dabei liegen die Ursprünge der großen Muskeln für die Bewegung des Hüftgelenks überwiegend am knöchernen Beckenring. Die Muskeln verlaufen dabei zu den Ansätzen am Femur bzw. an die Tibia und Fibula. Die hüftnahen Ansätze liegen in der Region des Femurs am Trochanter major bzw. minor, während sich die Ursprünge der Muskulatur im Bereich des Hüftgelenks an der Darmbeinschaukel befinden. Die Bewegungsrichtungen Flexion-Extension, Adduktion-Abduktion und Innenrotation-Außenrotation sind mit den dazugehörigen Muskeln vereinfacht in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Für die aktive Bewegung des Hüftgelenks verantwortliche Muskulatur [44,47,49,50]

Flexion	M. iliopsoas, M. rectus femoris, M. tensor fasciae latae, M. sartorius
Extension	M. gluteus maximus, M. biceps femoris, M. semitendinosus, M. semimembranosus
Adduktion	M. adductor brevis, M. adductor longus, M. adductor magnus, M. adductor minimus, M. gracilis, M. pectineus
Abduktion	M. gluteus medius, M. gluteus minimus
Innenrotation	M. tensor fasciae latae
Außenrotation	M. piriformis, M. obturatorius internus, M. obturatorius externus, M. gemellus superior, M. gemellus inferior

2.1.4 Bedeutung des labrokapsulären Komplexes für die Luxationsstabilität des Hüftgelenks

Der folgende Abschnitt beschreibt das Zusammenwirken und die Funktionsweise der beschriebenen Strukturen hinsichtlich der Luxationsstabilität des natürlichen Hüftgelenks. Das Labrum vergrößert die Gelenkfläche und schließt diese über den Äquator des Femurkopfes hinaus ab, was zur Bezeichnung „Nussgelenk“ führt. Dies hat zur Folge, dass der Hüftkopf nur durch eine Bewegung luxieren kann, welche (annähernd) senkrecht zur Pfanneneingangsebene erfolgen muss. Zusätzlich legt sich das Labrum eng an den Hüftkopf an und erzeugt somit einen zusätzlichen Schutz gegen Luxation auf Basis des atmosphärischen Drucks [16,51–53] und wahrscheinlich aufgrund des Bernoulli-Effekts (eigene nicht publizierte Befunde). Die Hüftgelenkskapsel schließt das Gelenk hermetisch nach außen ab. Der Kapsel-Labrum-Komplex wirkt durch den atmosphärischen Druck zusätzlich zur stabilisierenden Muskulatur, den Bändern und dem Kraft-Formschluss somit dauerhaft einer möglichen Luxation entgegen [45,46,53]. Darüber hinaus helfen die Kapselbänder durch ihre schraubenförmige Anbindung, eine Bewegung in den Grenzbereichen der Luxationsstabilität zu limitieren [47,49]. Durch die spezielle Form dieser Bänder (siehe Abbildung 3) sind deren vordere Anteile im aufrechten Stand angespannt [47,49], insbesondere das verhältnismäßig dicke Lig. iliofemorale. Die Ergebnisse von Smith et al. [54] konnten zeigen, dass die Kapselbänder unabhängig voneinander die Endbereiche bei einer Hüftbewegung einschränken und dadurch eine Luxation verhindern. Die das Gelenk umgebende, auch für die Fortbewegung wesentliche, Muskulatur überspannt das Hüftgelenk. Im Fall einer Luxation muss der Hüftkopf um eine Distanz, die größer als der Hüftkopfradius ist, orthogonal aus der Eingangsebene der Pfanne herausbewegt werden. Dadurch kommt es zur Dehnung der umliegenden Weichteile, etwa den Ligamenten der Muskulatur und der Haut, welche allesamt der Luxation als Widerstand entgegenwirken. Es kann darauf geschlossen werden, dass der labrokapsuläre Komplex ein wesentlicher Einflussfaktor ist, der zur Luxationsstabilität beiträgt.

2.2 Hüftendoprothetik

Das folgende Kapitel beschreibt den Aufbau einer Hüfttotalendoprothese und die wesentlichen Aspekte der Weichteilbehandlung im Rahmen der endoprothetischen Versorgung.

2.2.1 Aufbau und Funktion einer Hüfttotalendoprothese

Eine Hüfttotalendoprothese besteht aus den zwei Hauptkomponenten Pfanne und Schaft (siehe Abbildung 4). Der Bereich des Acetabulums wird durch eine Hüftpfanne ersetzt, die im Knochen durch Pressfit, Schraubensystem oder mithilfe von Knochenzement verankert wird. Das Pfannensystem besteht aus einem Pfannensockel und einem Pfanneneinsatz (sog. Inlay). Der Pfannensockel ist in unterschiedlichen Größen erhältlich (z. B. mit einem Durchmesser von 44 mm bis 68 mm in 2-mm Schritten). Die Sockel werden aus Titanwerkstoffen oder Cobalt-Chrom-Legierungen hergestellt. Dabei sind Hüftpfannen im Wesentlichen in zwei verschiedenen Formen gebräuchlich. Die erste Variante ist eine hemisphärische Halbkugelgeometrie. Die zweite Variante basiert auf derselben Geometrie, die Pfanne ist jedoch zum Pol hin abgeflacht. Von der Geometrie her weisen die Inlays im inneren Bereich eine Halbkugelform auf, in welcher der Hüftkopf artikulieren kann. Die Inlays bestehen in den meisten Fällen aus dem Kunststoff Polyethylen und seltener aus Keramik.

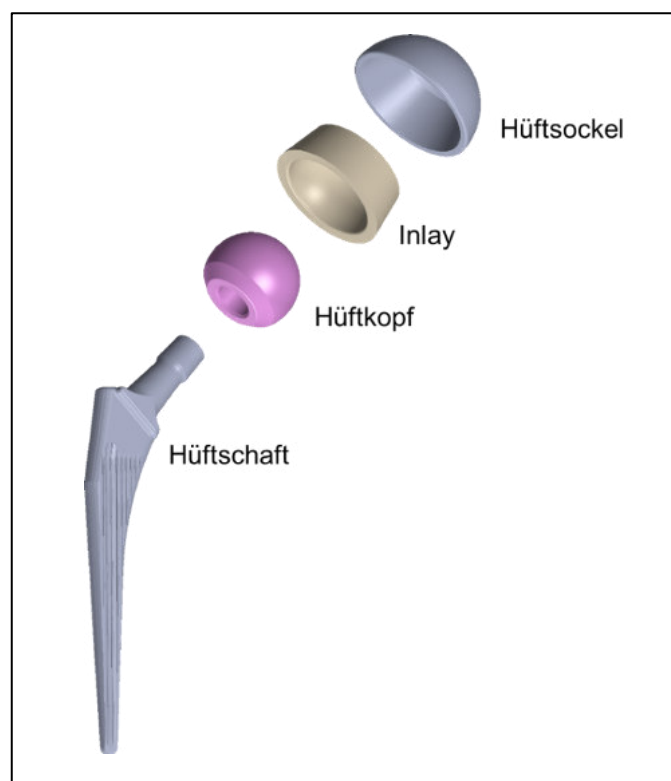


Abbildung 4: Explosionsdarstellung einer schematisierten Hüfttotalendoprothese

Primärendoprothetik

Die femorale Komponente der Hüfttotalendoprothese setzt sich aus dem Hüftschaft und dem Hüftkopf zusammen (siehe Abbildung 4). Die Hüftschäfte weisen einen 12/14 mm Konus auf. Auf diesen wird der Hüftkopf gefügt, der aus Metall oder Keramik bestehen kann. Aufgrund des geringen Abriebs werden heutzutage bevorzugt Keramikköpfe eingesetzt. Die üblicherweise verwendeten Endoprothesenköpfe weisen einen Durchmesser zwischen 28 mm und 36 mm auf. Bei Hochrisikopatienten werden jedoch Köpfe von 40 mm und 44 mm eingesetzt, um eine höhere Luxationsstabilität zu gewährleisten [55]. Die Auswahl der Hüftköpfe wird vom Operateur in Verbindung mit den Inlays und der Hüftpfanne abgestimmt. Die Hüftschäfte werden wie die Hüftpfannen vorwiegend aus einer Titan- oder Cobalt-Chrom-Legierung in verschiedenen Größen gefertigt. Der Schaft kann zementfrei oder zementiert verankert werden. Bei den Hüftschäften existieren in Abhängigkeit vom Hersteller unterschiedliche Schaftgeometrien. Gleichzeitig werden die Schäfte hinsichtlich ihrer Länge in Kurz-, Standard- und Langschäfte unterteilt. Es gibt Hüftschaftsysteme, die aufgrund ihrer symmetrischen Bauweise beidseitig eingesetzt werden können. Zudem existieren Schäfte, die eine anatomische Form aufweisen und somit körperseitenspezifisch sind.

Tumorendoprothetik

Im Falle einer weiten Resektion des proximalen Femur aufgrund von Knochentumoren oder umfangreichen Revisionsoperationen wird der resezierte Anteil oftmals durch einen proximalen Femurersatz rekonstruiert. Das Trochanter-Modul (siehe Abbildung 5) weist je nach Hersteller verschiedene Längen auf. Diese Größen bestimmen das Mindestmaß der Resektion für die Endoprothese. Im Fall von weiten Resektionen kann die Endoprothese über weitere modulare Elemente beliebig verlängert werden. Diese Art von Endoprothesen weist herstellerspezifisch unterschiedliche Formen im proximalen Bereich auf. Die das Hüftgelenk umgebenden Weichteile müssen aufgrund der notwendigen Tumorresektion zumeist großflächig vom Knochen abgelöst werden. Die Hersteller haben dabei unterschiedliche Philosophien hinsichtlich der benötigten Weichteilrefixation. Es existieren Varianten, die eine Refixation der Weichteile durch Nahtmaterial bzw. über Fixierungslöcher oder textile Anbindungsschläuche ermöglichen. Die Fixierungslöcher sind dabei im proximalen Bereich der Tumorendoprothese angebracht. Sie gestatten eine punktuelle Refixierung des Gewebes. Der textile Anbindungsschlauch wird hingegen über die Endoprothese gestülpt und anschließend durch eine Naht fixiert. Der Schlauch ermöglicht somit eine Weichteilrekonstruktion über die gesamte Fläche der Endoprothese.

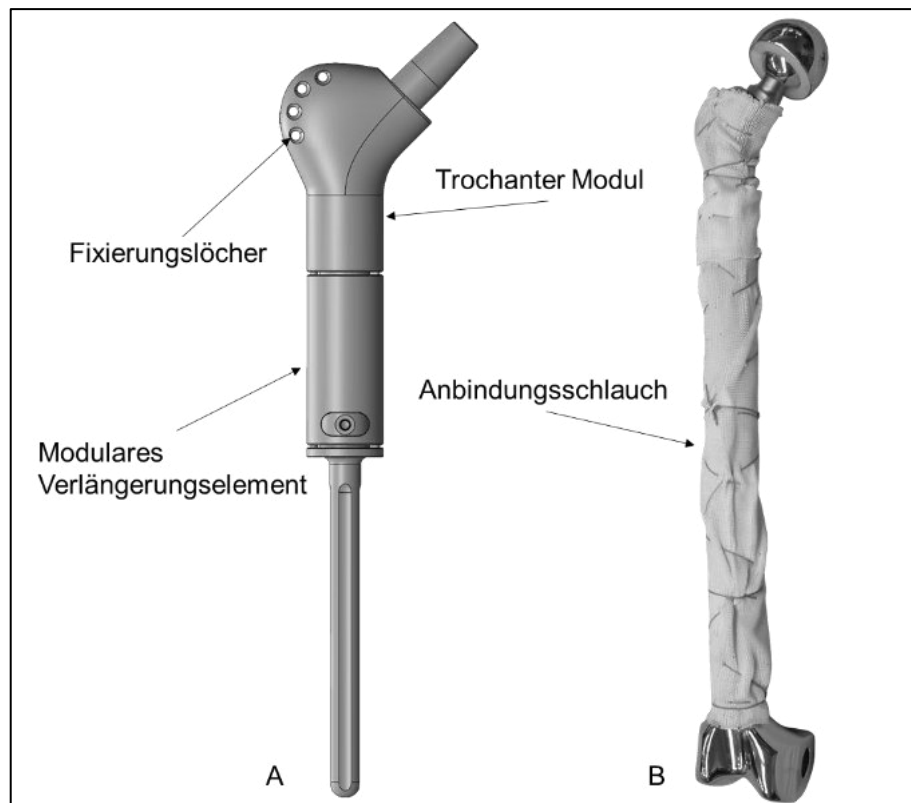


Abbildung 5: A) CAD-Modell eines proximalen Femurersatzes mit Refixationslöchern; B) Foto eines Femurtotalsersatzes mit Anbindungsschlauch

2.2.2 Bedeutung der Weichteilrekonstruktion nach endoprothetischer Versorgung des Hüftgelenks

Die Weichteilrekonstruktion spielt in der Hüftendoprothetik eine wesentliche Rolle, weshalb im Laufe der Zeit die operativen Zugänge stets weiterentwickelt und adaptiert wurden. In der Primärendoprothetik geht der Trend zum minimal- bzw. minderinvasiven Eingriff [12–15]. Dabei wird angestrebt, die betroffene Muskulatur so wenig wie möglich abzulösen und das Kapselgewebe größtenteils zu erhalten [16–20]. In der Tumorendoprothetik ist dies in Abhängigkeit von der Diagnose nur bedingt möglich. Sind die nötigen Randbedingungen erfüllt, ist es das primäre Ziel, die Muskulatur zu refixieren, um die Funktionsfähigkeit wiederherzustellen [21,56,57].

Die chirurgische Rekonstruktion der Hüftgelenkskapsel wird in der Literatur als wesentlicher Bestandteil der Luxationsprophylaxe, vor allem hinsichtlich der lateralen und anterolateralen Zugänge, kontrovers diskutiert [18,58–60]. Studien zu den posterioren bzw. posterolateralen Zugängen zeigen auch eine deutliche Verringerung der Luxationsrate [17,20]. Dieser Effekt konnte auch in einer Studie von Prietzel et al. [16] bei einem modifizierten lateralen transglutealen Zugang nachgewiesen werden. Es wurde dabei

gezeigt, dass durch einen Kapselerhalt die Anzahl der von Luxation betroffenen Patienten um 90 % vermindert werden kann. Zudem wurde belegt, dass durch den Kapselerhalt keinerlei Beeinträchtigungen für den Patienten entstehen. Hierauf aufbauend kann darauf geschlossen werden, dass der Erhalt der Hüftgelenkscapsel einen wesentlichen Punkt in der Luxationsprophylaxe darstellt und die Wiederherstellung der muskulären Anbindung für die Sicherstellung der Bewegungsfunktion notwendig ist. Ferner repräsentiert die Weichteilrekonstruktion einen essentiellen Bestandteil der endoprothetischen Versorgung.

2.3 Dezellularisierung

In der Weichteilrekonstruktion von Sehnen, Bändern und Muskeln finden dezellularisierte Matrices ihren Einsatz [22–31]. Das folgende Kapitel befasst sich mit dem Aufbau von Bindegeweben unter Berücksichtigung des Prozesses der Dezellularisierung.

2.3.1 Aufbau des Bindegewebes

Als mögliches Gewebe für eine Dezellularisierung bietet sich Binde- und Stützgewebe an. Diese bestehen aus dem Mesenchym, dem embryonalen Bindegewebe und seinen Nachfolgern. Im Gegensatz zu Muskel- und Nervengewebe weisen Binde- und Stützgewebe weniger Zellen als ausgedehnte Bereiche interzellulärer Matrix auf, die in ihrem Volumen die zellulären Komponenten erheblich übersteigen. Die Binde- bzw. Stützgewebe bestehen somit aus Bindegewebszellen und Extrazellulärmatrix. Weiterhin können diese je nach Art der Zellen in lockeres faserarmes, straffes faserreiches oder retikuläres Bindegewebe unterteilt werden.

Hinsichtlich der Bindegewebszellen werden ortsständige und freie Zellen unterschieden. Ortsständige Bindegewebszellen (Fibroblasten, Fibrozyten) produzieren die Extrazellulärmatrix, unter anderem kollagene Bindegewebsfasern. Freie Zellen sind dagegen dem Abwehrsystem zugehörig und treten bei Bedarf aus dem Blutkreislauf in periphere Gewebe aus. Hierdurch können die freien Bindegewebszellen ihre Position nahezu im gesamten Organismus verändern. Zudem wurde postuliert, dass die freien Bindegewebszellen Formen der weißen Blutkörperchen (Leukozyten) sind, welche sich aus der Blutbahn kommend im Bindegewebe angesiedelt haben [50]. Die interzelluläre Substanz wird je nach Ausbildung in Grundsubstanz und Bindegewebsfasern unterteilt. Die Grundsubstanz besteht überwiegend aus interstitieller Flüssigkeit (Proteoglykane, Glykosaminoglykane, Glykoproteine). Durch ihre wasserbindenden Eigenschaften sorgt sie unter anderem für die elastische Formstabilität des Gelenkknorpels. Die Glykoproteine, welche beispielsweise in der Basalmembran zu finden sind, beeinflussen die Haftung zwischen den Zellen und der Extrazellulärmatrix durch die auftretende Haftreibung. Die

Bindegewebsfasern können in Kollagenfasern, elastische Fasern sowie Retikulärfasern eingeteilt werden. Dabei stellen Letztere jedoch eine Sonderform der kollagenen Fasern dar. Die Kollagenfasern zeichnen sich durch eine außerordentlich hohe Zugfestigkeit aus [49,50]. Die Retikulärfasern verfügen mehrheitlich über biege-elastische und die elastischen Fasern primär über zug-elastische Eigenschaften. Im Bereich des straffen faserreichen Bindegewebes überwiegt der Faseranteil. Dieser kann geflechtartig oder parallelfaserig sein. Das straffe geflechtartige Bindegewebe stellt sich als dreidimensionales filzartiges Geflecht aus Kollagenfasern dar. Aufgrund des uneinheitlichen Faserverlaufs können Zugfestigkeiten in allen Richtungen festgestellt werden. Das Maß an Anisotropie ist gering. Das straffe parallelfaserige Bindegewebe hingegen bildet unter Zugbelastung eine mikroskopisch sichtbare Ausrichtung aus und weist ein höheres Maß an Anisotropie auf.

2.3.2 Einsatz dezellularisierter Gewebe

Die Dezellularisierung beschreibt den Vorgang (Kap. 2.4.2) der Trennung zellulärer Bestandteile aus seinem Ursprungsgewebe. Am Ende dieses Prozesses bleibt die extrazelluläre Struktur, die sogenannte Matrix, ohne die zellulären Anteile zurück. Die Verwendung einer dreidimensionalen, adaptierbaren Matrix aus biologischem Gewebe ist vielseitig. Beispielsweise kann sie als Gewebeersatz in verschiedenen Organsystemen und Strukturen des Stütz- und Bewegungsapparates dienen. Dabei können sich körpereigene Zellen in die Matrix integrieren, diese besiedeln und umbauen. Diese Vorgänge finden durch biologische Prozesse wie Zellteilung, Orientierungsbewegungen und Angiogenese statt. Zusätzlich kann durch den Einsatz von dezellularisiertem Gewebe das Auftreten von unerwünschten Gewebereaktionen wie Entzündungen, Nekrosen oder Einkapselungen verringert werden. Schulze-Tanzil et al. [61] stellten in ihren Untersuchungen fest, dass der wesentliche Erfolg der Wiederherstellung einer mechanischen Sehnenfunktion von mehreren Faktoren bestimmt wird. Dazu zählen zum einen der Prozess der Dezellularisierung und zum anderen die Rekolonisierungsstrategie. Studien [24,62–64], wie beispielsweise von Koch et al. [32,33], befassten sich bereits mit der Gewebereaktion nach subkutanen Implantationen. Für ihre Untersuchungen an Ratten implantierte die benannte Forschergruppe dezellularisiertes porcines Gewebe des Ösophagus, welches durch chemische Behandlung quervernetzt wurde. Die Auswertung der Biokompatibilität zeigte lediglich akute Entzündungs-, Umbau- sowie Abbaureaktionen in Folge der Implantation. Als Grund dafür wurden nicht mögliche DNA-Reste, sondern vielmehr eine Antigen-Antikörper-Reaktion angenommen, welche durch das Kollagen hervorgerufen wurde. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Quervernetzungen mittels Genipin ein gutes Gleichgewicht zwischen Gewebeabbau, Entzündungsreaktionen sowie der Infiltration von

gewebetypischen Zellen herstellt. Widersprüchliche Ergebnisse gehen aus der Studie von Aurora et al. [65] hervor, welche auf eine chronische Entzündungsreaktion nach der Implantation dezellularisierter Matrix aus humaner Haut hinweisen (GraftJacket®, Wright Medical, Arlington, USA). Auch nach Implantation von Systemen anderer Hersteller (TissueMEnd®, Stryker Orthopedics, Mahwah, NJ, USA) wurden ähnliche Reaktionen wie chronische Entzündungen, minimaler Gewebeabbau sowie fibröse Einkapselungen beobachtet, ähnlich denen bei der Verwendung nichtresorbierbarer, körperfremder Materialien. Laut Aurora et al. [65] liegt die Ursache hierfür in den DNA-Resten begründet, welche nicht komplett aus der Matrix entfernt wurden.

Mittels Zugversuchen am humanen Tractus iliotibialis analysierten Hammer et al. [65] die mechanischen Eigenschaften von nativem im Vergleich zu und dezellularisierten Geweben, mit dem Ziel, die Ergebnisse beider Gewebezustände miteinander zu vergleichen. Die Studie konnte zeigen, dass es keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Zugfestigkeit beider Zustände gibt. Die zellfreien Proben weisen eine geringfügig höhere Dehnung als die nativen Proben auf, wodurch der Einsatz dezellularisierter Tractus iliotibialis-Patches bei Sehnen- sowie Bänderrissen befürwortet wird. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen entwickelte und adaptierte Gögele et al. [66] ein Protokoll für die Dezellularisierung und Rezellularisierung des Tractus iliotibialis. Hierbei gestaltet sich eine vollständige Dezellularisierung schwieriger als bei anderen Geweben, die eine niedrigere Dichte aufweisen. Gleichzeitig werden Rekolonisierungsstrategien auf Basis von homotopen Fibroblasten und mesenchymalen Stromazellen vorgestellt.

2.4 Methodisches Vorgehen

Der folgende Abschnitt beschreibt das methodische Vorgehen in den für diese Promotionsarbeit durchgeführten Studien zur Ermittlung der mechanischen Gewebeeigenschaften. Weiterhin wird das angewandte Verfahren zur Dezellularisierung beschrieben.

2.4.1 Prüfprotokoll für die mechanische Charakterisierung

Der Ablauf des Prüfprotokolls für die mechanischen Untersuchungen ist in Abbildung 6 dargestellt.

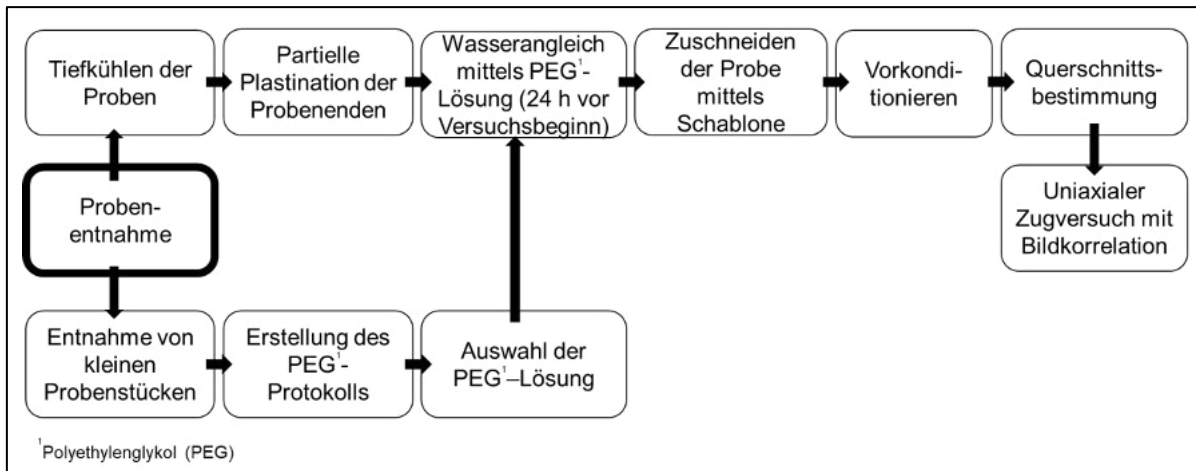


Abbildung 6: Ablaufplan für die Durchführung der mechanischen Testung

Partielle Plastination

Die Einspannung der Gewebeproben für den uniaxialen Zugversuch mit unzureichender Klemmkraft kann dazu führen, dass die Proben während der Testung aus den Klemmböcken herausgezogen werden. Dieser Vorgang wird als Schlupf bezeichnet. Zur Reduktion des Gewebeschlupfes und zur Gewährleistung einer einheitlichen Messlänge wurde die Technik der partiellen Plastination angewandt [67,68]. Hierbei wurde der geplante Messbereich vor der Plastination zwischen zwei mit Gelatine bestrichene Abstandshalter geklemmt. Zum einen erzeugte dieses Verfahren einen definierten Abstand für alle Proben, und zum anderen entstand ein Schutz des Gewebes für die weiteren Arbeitsschritte. Vor der Plastination der Proben wurden zunächst unter Zuhilfenahme von Azeton Fett- und Wasseranteile aus den Probenenden gelöst (siehe Abbildung 7A). Anschließend erfolgte die Entnahme der Probenenden aus dem Azetonbad und direkt das Bestreichen der Proben mit einem Harz-Härter-Füllstoff-Gemisch in einem Mischungsverhältnis von 1:1:1 direkt (RENCAS[®] FC 52 BD Polyol, Huntsman Corporation, Texas, USA; RENCAS[®] FC 52/53 BD Isocyanat, Huntsman Corporation; Aluminiumhydroxid, Gößl + Pfaff GmbH, Karlskron, Deutschland). Dadurch konnte gewährleistet werden, dass das Gemisch direkt in die Probe einzog. Nachfolgend wurde die Probe im benannten Harz-Härter-Füllstoff-Gemisch im Verhältnis 1:1:3 eingebettet [67,68]. Zur Stabilisierung der Probenenden wurde diese jeweils mit einer Pertinax-Platte (PF CP 201, Dr. Müller GmbH, Ahlhorn, Deutschland) stabilisiert und mit Halteklemmen fixiert. Nach der Aushärtung wurden das überstehende Einbettmittel entfernt, die Abstandshalter von der Probe gelöst und diese schließlich für den osmotischen Wasserangleich vorbereitet. Dazu wurden die Proben nach der partiellen Plastination in einen Dialyseschlauch gelegt und beide Enden verschlossen (siehe Abbildung 7 B).

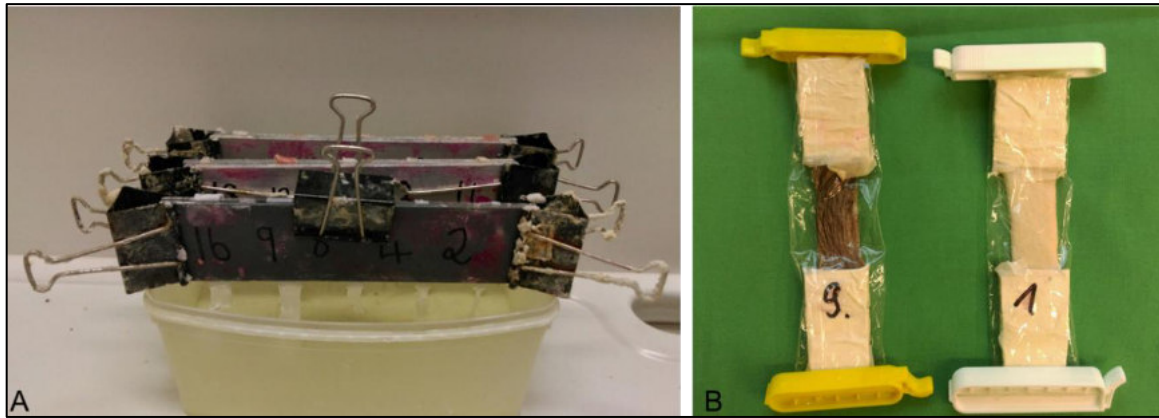


Abbildung 7: A) Entfettung und Entwässerung der freiliegenden Probenenden durch das Azetonbad; B) Eingebettete Probenenden nach der Vorbereitung für den Wasserangleich

Angleichung des Wassergehalts

Die Angleichung des Wassergehalts diente dazu, die Proben an den nativen Ausgangszustand anzupassen und die natürliche Streuung der Gewebeproben zu minimieren. Für den Prozess des Wasserangleichs fand die „osmotische Stresstechnik“ von Hammer et al. [69–71] Anwendung. Diese Methode besteht aus mehreren Schritten. Zu Beginn wurde ein Polyethylenglykol-Protokoll (PEG-Protokolls) erstellt. Dabei wurde die optimale Konzentration und Verweildauer des Gewebes in der PEG-Lösung ermittelt, die den Zielwassergehalt der Gewebeprobe einstellt [69]. Im nächsten Schritt wurden die Proben für den zuvor ermittelten Zeitraum mit der jeweiligen Konzentration der PEG-Lösung osmotisch angeglichen. Dieses Vorgehen stellte einen Kompromiss aus langer Probenverweildauer in der PEG-Lösung bis zum Erreichen des Zielwassergehalts und der Genauigkeit der Einstellung des Wassergehalts dar, welchen es sorgfältig abzuwägen galt. So führte eine lange Verweildauer der Proben zu einer sehr genauen Angleichung, allerdings auch zur Autolyse dieser. Erst unmittelbar vor den eigentlichen Versuchen wurden die Proben aus der PEG-Lösung entnommen, um einen einheitlichen Wassergehalt aller Proben zu gewährleisten.

Probengeometrie

Die Auswahl der Probengeometrie orientierte sich an der DIN 50125 [72] für metallische Zugproben. Diese Geometrie wurde aufgrund variierender Längen und Breiten, die sich aus der unterschiedlichen biologischen Herkunft der Gewebeproben ergaben, adaptiert. Basierend darauf unterschieden sich die Abmessungen der einzelnen Probekörper voneinander, weshalb die ideale Abmessung unter Berücksichtigung der zu prüfenden

Gewebe entsprechend ausgewählt werden musste. Die Größenadaptionen für die Probengeometrie nach DIN 50125 sind in Abbildung 8 dargestellt.

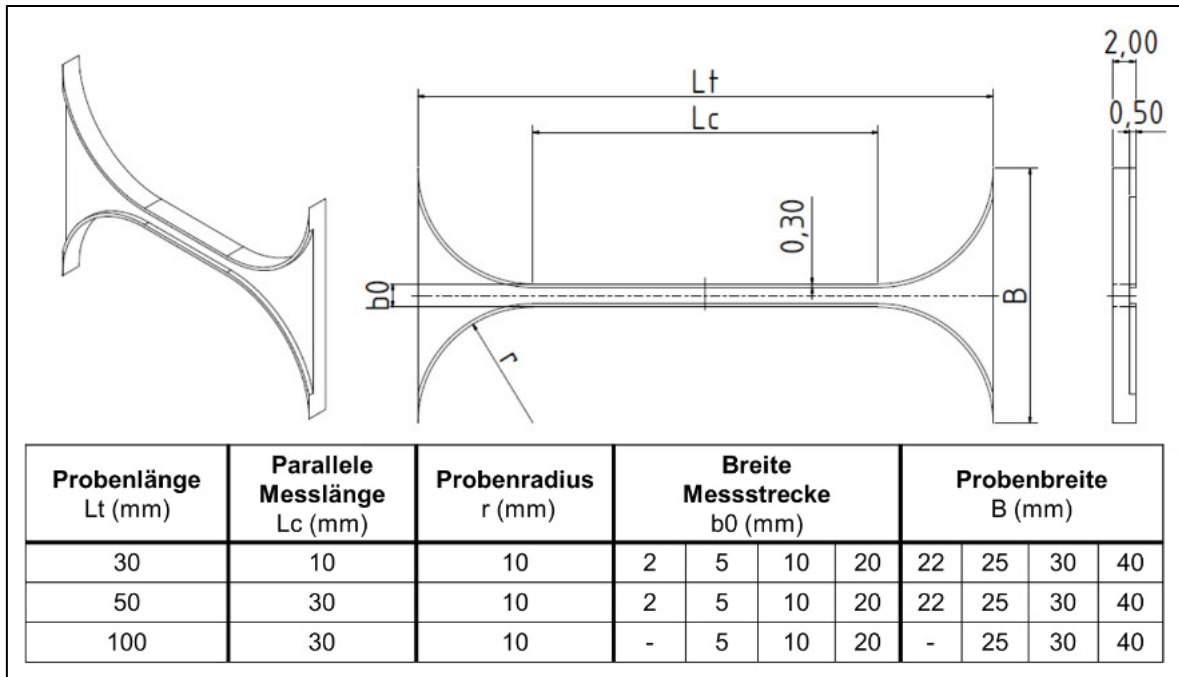


Abbildung 8: Technische Zeichnung der Größenadaption für die Probengeometrie, angepasst an DIN 50125 [70]

Zur Verwendung einer einheitlichen Probenform wurden eigens angefertigte Schablonen zwischen die plastinierten Probenenden geklemmt. Anschließend wurde das Gewebe entlang der aufgelegten Schablone exakt ausgeschnitten. Dieses Vorgehen gewährleistete eine reproduzierbare Form der Proben. Für alle Proben einer Versuchsreihe wurde die gleiche Schablone verwendet. Die kleinste Probenbreite bestimmte somit die Schablonenbreite.

Ermittlung des Probenquerschnitts

Der Probenquerschnitt wurde über Abformung bestimmt [68]. Die Abformung des Probenquerschnitts erfolgte nach der Vorkonditionierung und wurde in der Probenmitte durchgeführt. Im Vorfeld der Versuche sind entsprechende Abformlöffel (REF 2112, Voco GmbH, Cuxhaven, Deutschland) hergestellt worden, welche eine U-Form aufweisen (vgl. Abbildung 9). Die Löffel wurden mit einer flexiblen Haltevorrichtung in der Probenmitte positioniert. Daraufhin erfolgte die Abformung des Querschnitts, indem ein additionsvernetzendes Silikonabdruckmaterial (Vinylpolysiloxan VPS Hydro 380, HENRY SCHEIN Medical GmbH, Hamburg, Deutschland) auf die Probe aufgetragen wurde. Nach

der Trocknung des Abformmaterials wurden die Proben sorgfältig aus dem Abdruckmaterial herausgetrennt (Abbildung 9).

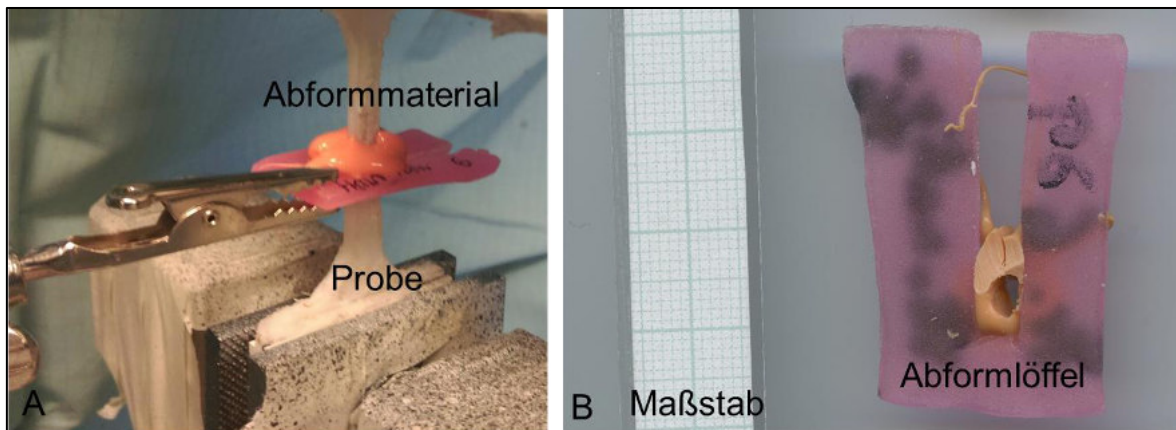


Abbildung 9: A) Prozess des Abformens; B) Probennegativ mit Maßstab

Das Probennegativ wurde beschriftet und im Anschluss an die Versuche mit einem hochauflösenden Flachbettscanner digitalisiert. Ein ebenfalls in den Scanner eingelegter Referenzmaßstab diente zur Bestimmung des Probenquerschnitts. Mit Hilfe der Software Datinf® Measure (Datinf GmbH, Tübingen, Deutschland) konnten die Querschnitte der Proben unter Nutzung dieser Referenz schnell und präzise ermittelt werden.

Zyklische Belastung

Verschiedene Untersuchungen in der Literatur zeigten eine Abhängigkeit zwischen dem Materialverhalten und einer zyklischen Vorbelastung vor der Durchführung von Bruchlastversuchen [73–75]. Dabei wurde nachgewiesen, dass sich die Varianz der mechanischen Eigenschaften in den Versuchen nach zyklischer Vorbelastung, dem sogenannten „Preconditioning“, verringerte [76]. Diese Vorkonditionierung eignet sich insbesondere für Sehnen und Bandstrukturen. Im Rahmen der Untersuchungen hat sich eine Vorbelastung von zehn bis zwanzig Zyklen etabliert (siehe Abbildung 10). Die Abschätzung der zur Vorkonditionierung notwendigen Zyklenanzahl basierte auf Untersuchungen von Cheng et al. [75] und Fung et al. [74] sowie den Arbeiten von Hammer et al. [69,77]. In ihren Studien wurde nachgewiesen, dass die Spannungs-Dehnungsdaten nach vier bis zehn Zyklen einen vergleichsweise konstanten Wert annehmen (siehe Abbildung 10). Eine zu lang andauernde Vorkonditionierung führte wiederum zu einer erheblichen Austrocknung sowie zu einer Veränderung der mechanischen Materialeigenschaften des Gewebes. Für Testungen von Muskelgewebe sollte die Vorkonditionierung nicht verwendet werden. Aufgrund des strukturellen Aufbaus von

Muskelgewebe würde die Vorkonditionierung bereits vor den Messversuchen zum Versagen der Muskelfasern führen.

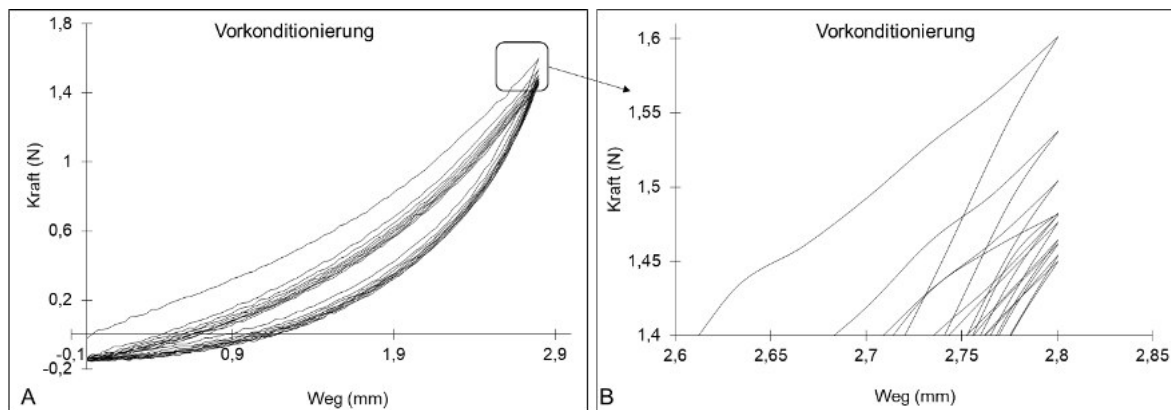


Abbildung 10: A) Hysteresekurve der zyklischen Belastung; B) Auszug aus dem linken Diagramm zur Veranschaulichung der zyklischen Veränderungen

Die zyklische Belastung wurde mit einer Prüfgeschwindigkeit von 20 mm/min für Dehnungen von 0-5 % durchgeführt. Die Dehnung bezog sich hierbei auf die Ausgangslänge der Proben. Zur Vermeidung einer vorzeitigen Materialschädigung wurde ein Abbruchkriterium für die zyklische Belastung definiert. Dieses Kriterium wurde anhand einer Pilot-Versuchsreihe mit dem zu prüfenden Gewebe ermittelt. Das Abbruchkriterium für die durchgeführten Versuche trat ein, sobald 30 % der im Vorfeld ermittelten Maximalkraft auf die Probe einwirkten.

Bildkorrelation

Die Bestimmung der exakten Dehnung über ein zusätzliches optisches Messsystem war für die vorgestellte Versuchsreihe empfehlenswert [77]. Es ermöglichte nachträglich, den eventuell auftretenden Schlupf der Proben in der Einspannung zu erkennen und die Messdaten um den hierdurch auftretenden Fehler zu korrigieren. Für die Nutzung der Bildkorrelation musste die Probe im Rahmen der Versuchsdurchführung ein Specklemuster erhalten. Das benötigte Muster wurde mit Hilfe einer Sprühdose auf die Probe aufgetragen. Es stellte sich während der Versuche heraus, dass es ausreichte, ein ausschließlich dunkles Specklemuster auf die Probe aufzutragen. Eine Grundierung der Probe mit weißer Farbe war somit nicht notwendig. Das Specklemuster bestand aus einer dunklen Farbe auf Wasserbasis. Das Auftragen erfolgte erst im Anschluss an die zyklische Vorbelastung der Proben, um ein vorzeitiges Verwischen der Farbe zu vermeiden. Durch das Specklemuster auf der Probe war es möglich, mit Hilfe einer digitalen Bildkorrelation das Verschiebungsfeld der Probe zu messen und die resultierende Dehnung der Probe zu ermitteln.

Versuchsparameter

Die quasistatischen uniaxialen Zugversuche wurden mit den in Tabelle 2 aufgeführten Parametern durchgeführt.

Tabelle 2: Versuchsparameter für quasi-statische uniaxiale Zugversuche

Vorkonditionierung	
Prüfgeschwindigkeit	20 mm/min
Zyklen	10
Dehnuntergrenze	0 %
Dehnobergrenze	5 %
Abbruchkriterium	30 % der maximal aufgetretenen Kraft
Versagensprüfung	
Prüfgeschwindigkeit Versagenstest	20 mm/min
Vorkraft	1 N
Abbruchkriterium	40 % Kraftabfall

2.4.2 Verfahren der Dezellularisierung

Dieser Abschnitt beschreibt das Verfahren (siehe Abbildung 11), welches für die Dezellularisierung verwendet wurde [32,33]. Im ersten Schritt wurde den Spendern das zu prüfende Gewebe unter sterilen Bedingungen entnommen. Um den durch Trocknung auftretenden Schädigungen des Gewebes nach der Entnahme vorzubeugen, wurde dieses in isotoner Natriumchlorid-Lösung (0,9 Masse%) zwischengelagert. Dies ermöglichte zudem den problemlosen Transport des Gewebes zwischen den Entnahme- und Testeinrichtungen. Der Vorgang des Heraustrennens der zellulären Bestandteile aus dem Gewebe gelang durch die Lagerung in einer 1,0 Masse% Natriumdodecylsulfat-Lösung (SDS; Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland). Der Zeitraum für die Dezellularisierung des Gewebes war abhängig vom verwendeten Organ und betrug zwischen einer und vier Wochen. Nach der vollständigen Dezellularisierung wurde das Gewebe mit Wasser von der Natriumdodecylsulfat-Lösung gereinigt. Alternativ kann dieser Vorgang auch mit einer phosphat-gepufferten Natriumchlorid-Lösung erfolgen.

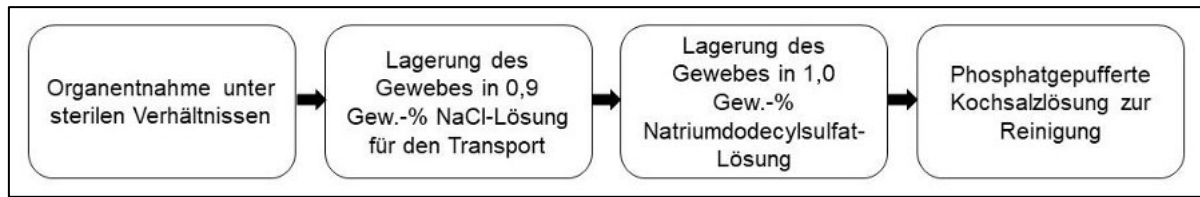


Abbildung 11: Arbeitsschritte bei der Dezellularisierung von Gewebe

3 Publikationen

3.1 Tensile properties of the hip joint ligaments are largely variable and age-dependent – An in-vitro analysis investigating an age span between 14 and 93 years

S. Schleifenbaum¹, T. Prietzel¹, C. Hädrich, R. Möbius, F. Sichtung, N. Hammer

¹ These authors have contributed equally to this work.

Journal of Biomechanics 7/2016

Zum besseren Verständnis der passiv-mechanischen Eigenschaften der Hüftkapselbänder wurde das mechanische Verhalten der einzelnen Kapselbänder mit Hilfe einer uniaxialen Zugprüfung untersucht. Anschließend wurden die erhobenen Spannungs-Dehnungsdaten hinsichtlich der Parameter Elastizitätsmodul, Versagensspannung sowie Bruchdehnung ausgewertet. Die Ergebnisse zeigen keine signifikanten mechanischen Unterschiede zwischen den einzelnen untersuchten Kapselbändern. Obwohl gezeigt werden konnte, dass die Hüftkapselbänder zur Hüftgelenksstabilität auf Grund ihrer passiven Spannungs-Dehnungs-Eigenschaften beitragen, können die Ligg. ischiofemorale und iliofemorale die Luxation aufgrund ihrer Länge und Elastizität nicht effektiv verhindern.

Die Studie ermittelte die mechanischen Kenndaten der Hüftkapselbänder und bietet somit die Grundlage für die Entwicklung einer künstlichen Gelenkkapsel.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Biomechanics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jbiomech
www.JBiomech.com

Tensile properties of the hip joint ligaments are largely variable and age-dependent – An in-vitro analysis in an age range of 14–93 years



Stefan Schleifenbaum^{a,b,1}, Torsten Prietzel^{b,c,1}, Carsten Hädrich^d, Robert Möbius^e, Freddy Sichting^f, Niels Hammer^{a,*}

^a Department of Anatomy, University of Otago, Dunedin, New Zealand

^b Department of Orthopedics, Trauma and Plastic Surgery, University of Leipzig, Leipzig, Germany

^c Department of Orthopedics and Trauma Surgery, HELIOS Clinic Blankenhain, Blankenhain, Germany

^d Institute of Forensic Medicine, University of Leipzig, Germany

^e Institute of Anatomy, University of Leipzig, Leipzig, Germany

^f Institute of Sport Science, Department Human Locomotion, Chemnitz University of Technology, Chemnitz, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 7 September 2016

Keywords:

Atmospheric pressure

Dislocation

Hip joint capsular ligaments

Mechanical tensile properties

ABSTRACT

Introduction: Hip joint stability is maintained by the surrounding ligaments, muscles, and the atmospheric pressure exerted via these structures. It is unclear whether the ligaments are capable of preventing dislocation solely due to their tensile properties, and to what extent they undergo age-related changes. This study aimed to obtain stress–strain data of the hip ligaments over a large age range.

Methods: Stress–strain data of the iliofemoral (IL), ischiofemoral (IS) and pubofemoral ligament (PF) were obtained from cadavers ranging between 14 and 93 years using a highly standardized setting. Maximum strains were compared to the distances required for dislocation.

Results: Elastic modulus was 24.4 (IL), 22.4 (IS) and 24.9 N/mm² (PF) respectively. Maximum strain was 84.5%, 86.1%, 72.4% and ultimate stress 10.0, 7.7 and 6.5 N/mm² for the IL, IS and PF respectively. None of these values varied significantly between ligaments or sides. The IS' elastic modulus was higher and maximum strain lower in males. Lower elastic moduli of the PF and higher maximum strains for the IS and PF were revealed in the ≥ 55 compared to the < 55 population. Maximum strain exceeded the dislocation distance of the IS without external hip joint rotation in females, and of the IS and cranial IL under external rotation in both genders.

Discussion: Tensile and failure load properties of the hip joint ligaments are largely variable. The IS and PF change age-dependently. Though the hip ligaments contribute to hip stability, the IS and cranial IL may not prevent dislocation due to their elasticity.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The ligaments of the human hip joint are considered as mechanical stabilizers preventing dislocation passively (Walters et al., 2014). The fibrous complex consisting of both the ligaments and the joint capsule helps mediate additional stabilizing forces such as the hip-centralizing effects of atmospheric pressure. Given the helical orientation of the hip joint ligaments, namely the iliofemoral ligament (IL), the ischiofemoral ligament (IS) and the pubofemoral ligament (PF), they are assumed to

limit the range of motion of the hip joint in addition to the bony constraints of the femur and acetabulum (Burroughs et al., 2005; van Arkel et al., 2015).

However, there is some ambiguity in the literature and it remains unclear whether the ligaments are truly preventing dislocation through their mechanical properties or whether the stabilizing effect is more effectively mediated via the muscles (Hewitt et al., 2001). Previous reports on hip joint capsule mechanics mostly apply to the ligaments only. Moreover, existing studies including our recent investigation on hip joint mechanics lack of standardization, sample size, are performed with tissues in a chemically fixed condition or include tissues with varying fiber orientations (Elkins et al., 2011; Hewitt et al., 2001, 2002). To date, it is unclear if the hip joint ligaments undergo age-related change

* Correspondence to: Department of Anatomy, University of Otago, Lindo Ferguson Building, 270 Great King Street, Dunedin 9016, New Zealand. Fax: +64 3 479 7254.

E-mail address: nlshammer@googlemail.com (N. Hammer).

¹ These authors have contributed equally to this work.

as most of the published experiments were carried out in an exclusively geriatric population.

Addressing these issues, the given experimental study aimed at obtaining mechanical data of fresh hip joint ligaments, revisiting the tensile properties of the IL, IS and PF. Using a highly standardized setting for tissue preparation, testing and evaluation we aimed at investigating age-related alterations of the ligaments in an age range of 14–93 years.

It was first hypothesized that the tensile properties of the IL, IS and PF ligaments vary between their sites (I_A) and their side (I_B) as well as gender (I_C). The second hypothesis (II) was that the IL, IS and PF undergo an age-related decrease in elasticity. The third hypothesis was that the hip joint ligaments prevent hip joint dislocation passively given their elasticity.

2. Materials and methods

2.1. Sample acquisition and processing

Forty human hip joint capsules were removed bilaterally from 21 cadavers (9 ♀, 12 ♂) with a mean age of 59.7 ± 26.6 years (range 14–93 years) at the Departments of Forensic Medicine and Anatomy, University of Leipzig, Germany. The tissues were obtained within 48 h or less and in a fresh (anatomically unfixed) condition. Further information regarding the donors including the cause of death is given in Table 1. The university's ethics committee approved this study (protocol number 051-15-09032015). Following surgical exposure of the ligament complex via a lateral approach to the hip joint the IL, IS and PF were resected from the acetabular rim proximally, and distally at the greater and lesser trochanter as well as at the intertrochanteric region as indicated in Fig. 1. All ligaments were precooled and shock frozen at -85°C for storage and transportation.

2.2. Partial plastination and osmotic adjustment of water content

Prior to mechanical testing, the tissues were slowly defrosted and their ends partially plastinated as described elsewhere (Hammer et al., 2014; Sichting et al., 2015). The samples' water content was adjusted to 69% by mass, using the osmotic stress technique (Parsegian et al., 1995; Zernia and Huster, 2006) as described in our previous setup (Hammer et al., 2016, 2014; Schleifenbaum et al., 2016).

2.3. Mechanical testing

The central parts of the ligaments were sectioned before starting the uniaxial tensile test using a template for a defined region of failure. The tensile tests were carried out

using a uniaxial testing machine (Zwick/Roell, Ulm, Germany and Instron, Norwood, MA, USA), equipped with a 2.5 kN load cell (relative value of accuracy 0.5%). Optical image correlation was carried out using a Q-400 system (VRS 4.4.1.354, Dantec Dynamics, Ulm, Germany) with Istra 4D software (VRS 4.4.1.354, Dantec Dynamics, Ulm, Germany). The samples were clamped with their major fiber orientation in the direction of load application. Preconditioning was then performed with a crosshead displacement $v=20$ mm/min and a maximum strain of 5% (Pieroh, 2016). Following this, the samples' cross-sections were cast in VPS Hydro 380 (Henry Schein Medical GmbH, Hamburg, Germany and REF 2112, Voco GmbH, Cuxhaven, Germany). A speckle pattern was sprayed onto the samples facilitating image correlation. Tensile data (displacement and force) were then obtained at a crosshead displacement speed of $v=20$ mm/min. The abort criterion for the uniaxial testing was defined by a decrease of at least 30% of the respective maximum force level I.

2.4. Data evaluation, statistical analysis and numerical evaluation of maximum strain vs. dislocation distance

Sample cross sections were scanned from the casts at a resolution of 1200 dpi on a Perfection 7V750Pro (Seiko Epson Corporation, Suwa, Japan) and determined using Measure 2.1d software (DatInf GmbH, Tübingen, Germany). Elastic modulus was computed as the secant modulus from the linear region of the tensile data generated on RStudio (RStudio, Inc., Boston, MA, USA). The tensile data was obtained to assess maximum stress and corresponding strain values. SPSS 23.0 software (IBM, IL, USA) and Excel 2013 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) were used to evaluate the data

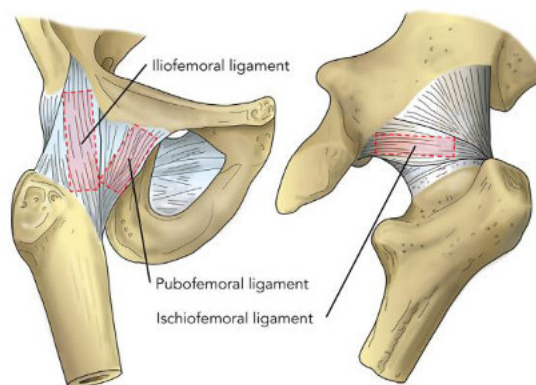


Fig. 1. The ligaments of the hip joint, anterior view (left) and posterior view (right). The red regions indicate where the respective ligaments were removed. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 1
Specimen data including gender, age, body height and weight and the cause of death.

Gender	Age [years]	Body length [cm]	Body weight [kg]	Cause of death
♀	14	154	44	Traumatic brain injury
♂	18	174	61	Unclear, non-traumatic
♂	20	178	65	Cervical spinal cord injury
♂	25	185	87	Traumatic hemothorax
♂	26	169	77	Peripheral vessel injury
♂	26	187	66	Heroin intoxication
♀	35	174	72	Unclear, non-traumatic
♂	41	177	56	Aspiration of foreign body
♂	51	175	65	Peripheral vessel injury
♂	53	183	91	Brain injury
♂	63	172	102	Traumatic hemothorax
♀	65	n/a	98	Hepatic tumor
♂	71	177	81	Cardiac insufficiency
♂	74	173	80	Myocardial infarction
♂	76	169	47	Septic shock
♀	77	158	68	Ethyl-toxic liver disease
♂	81	n/a	87	Mesenteric infarction
♀	81	n/a	56	Acute kidney failure
♀	87	n/a	62	Hepatic tumor
♀	90	n/a	84	Cardiac insufficiency
♀	93	n/a	54	Cardiac insufficiency
9 ♀, 12 ♂	59.7 ± 26.6	173.7 ± 8.9	70.0 ± 17.5	

statistically. The Kolmogorov–Smirnov test was used to determine normal distribution. An ANOVA test with post-hoc analysis was applied to compare the IL, IS and PF data. Side- and gender-related comparisons were performed with the Wilcoxon-Signed-Ranks test or the paired Student's *T*-test. A Pearson's test was applied for determining correlations. *P* values of 5% or less were considered as statistically significant. All values were presented in mean values \pm standard deviations.

For a numerical comparison between maximum strain and the least distance required for dislocation, data on hip joint ligament length (Weidner et al., 2012) and fiber orientation (Fick, 1911; Lanz and Lang, 2004; Sobotta and Putz, 2004) were used. The assumed fiber angles between the acetabular rim and the hip joint ligaments in a 0° hip joint extension were 30°, 45° and 90° for the IL, IS and PF respectively (Smith et al., 2014). Mean femoral head diameters of 42.2 and 48.2 mm were used for females and males respectively (Milner and Boldsen, 2012). Polar diagrams were adapted from Weidner et al. (2012) for visualization of the ligament origins at the right acetabulum, strains accounting for more than ½ the diameter size were considered to be potentially causing dislocation.

3. Results

3.1. Elastic modulus, maximum strain and ultimate stress were similar and not significantly different between the iliofemoral, ischiofemoral and pubofemoral ligaments

The mean elastic modulus was 24.4 ± 21.0 N/mm² for the IL, 22.42 ± 21.1 N/mm² for the IS and 24.9 ± 30.8 N/mm² for the PF, any difference was non-significant (Fig. 2A; Table 2). Similar findings were

observed for the maximum strain with $84.5 \pm 36.0\%$, $86.1 \pm 30.0\%$ and $72.43 \pm 33.21\%$ for the IL, IS and PF respectively with non-significant differences, (Fig. 2B). Ultimate stress averaged 10.0 ± 7.6 , 7.7 ± 6.9 and 6.5 ± 4.2 N/mm² for the IL, IS and PF respectively, the differences were also non-significant (Fig. 2C).

3.2. Gender and side comparisons tend to have lower elastic moduli and higher maximum strains in females compared to males

The elastic modulus of the IS was significantly lower in females than in males (11.3 ± 9.9 vs. 28.5 ± 23.3 N/mm²; $p=0.018$; Suppl. Fig. 1; Table 2). The maximum strain of the IS was significantly higher in females than in males ($110.0 \pm 43.8\%$ vs. $73.0 \pm 28.2\%$; $p=0.02$). Ultimate stress was not significantly different between females and males with 6.0 ± 5.5 and 8.7 ± 7.5 N/mm² respectively. No such gender differences were found for the IL and the PF. Moreover, the side-related differences did not reach a statistically significant level.

3.3. Significant alterations were found for the mechanical properties of the ilio- and pubofemoral ligaments between younger and older specimens

The averaged values from both sides were compared between the tissues of a young group (< 55 years, $n=15$) and that of an old

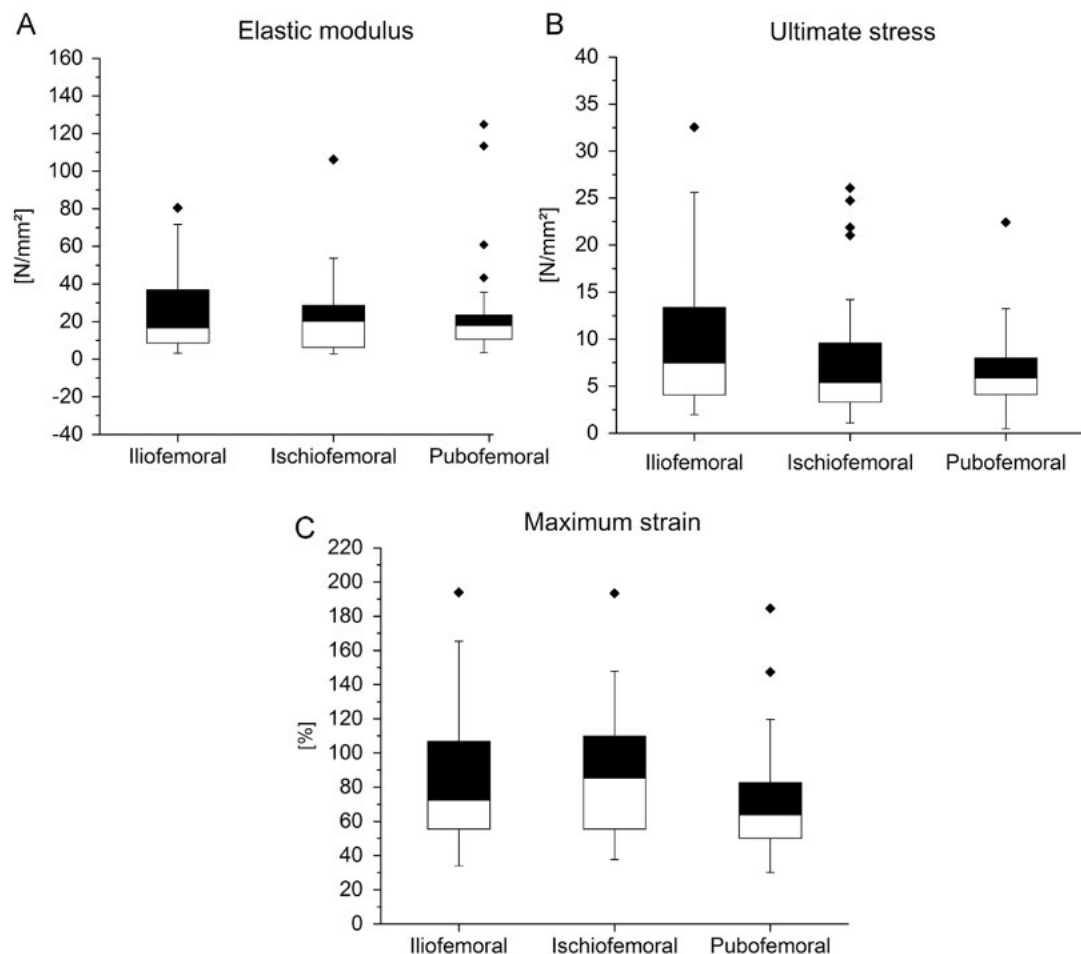


Fig. 2. Box plots of the mechanical properties obtained from the ilio-, ischio- and pubofemoral ligaments, (A) Elastic modulus, (B) Ultimate stress, (C) Maximum strain. Whiskers indicate the 25th and 75th percentile, black rectangles indicate the outliers.

Table 2

Gender- and side-dependent elastic modulus, maximum strain and ultimate stress data are given for the ligaments of the hip joint capsule along with the global data averaging the data of the ligaments. SD = standard deviation.

			Elastic modulus Mean \pm SD	Ultimate Stress Mean \pm SD	Maximum Strain Mean \pm SD
Iliofemoral	Gender	♀	17.11 \pm 16.17	7.33 \pm 5.75	92.27 \pm 33.68
		♂	28.48 \pm 22.52	11.42 \pm 8.29	80.25 \pm 37.40
	Side	left	29.01 \pm 26.09	11.05 \pm 9.58	79.35 \pm 34.98
		right	19.57 \pm 12.74	8.82 \pm 4.90	90.03 \pm 37.52
	Global		24.44 \pm 20.95	9.97 \pm 7.64	84.52 \pm 36.03
Ischiofemoral	Gender	♀	11.33 \pm 9.93	6.02 \pm 5.52	109.88 \pm 43.76
		♂	28.52 \pm 23.31	8.66 \pm 7.52	72.95 \pm 27.18
	Side	left	28.45 \pm 26.28	9.63 \pm 7.44	90.53 \pm 45.43
		right	16.77 \pm 13.36	5.93 \pm 6.04	81.87 \pm 29.87
	Global		22.42 \pm 21.14	7.72 \pm 6.90	86.06 \pm 37.8
Pubofemoral	Gender	♀	23.00 \pm 32.50	6.86 \pm 5.36	76.16 \pm 33.72
		♂	26.14 \pm 30.47	6.29 \pm 3.36	70.08 \pm 33.58
	Side	left	26.67 \pm 34.88	5.48 \pm 3.35	57.95 \pm 15.19
		right	23.66 \pm 28.43	7.26 \pm 4.62	82.89 \pm 38.82
	Global		24.92 \pm 30.77	6.51 \pm 4.17	72.43 \pm 33.21

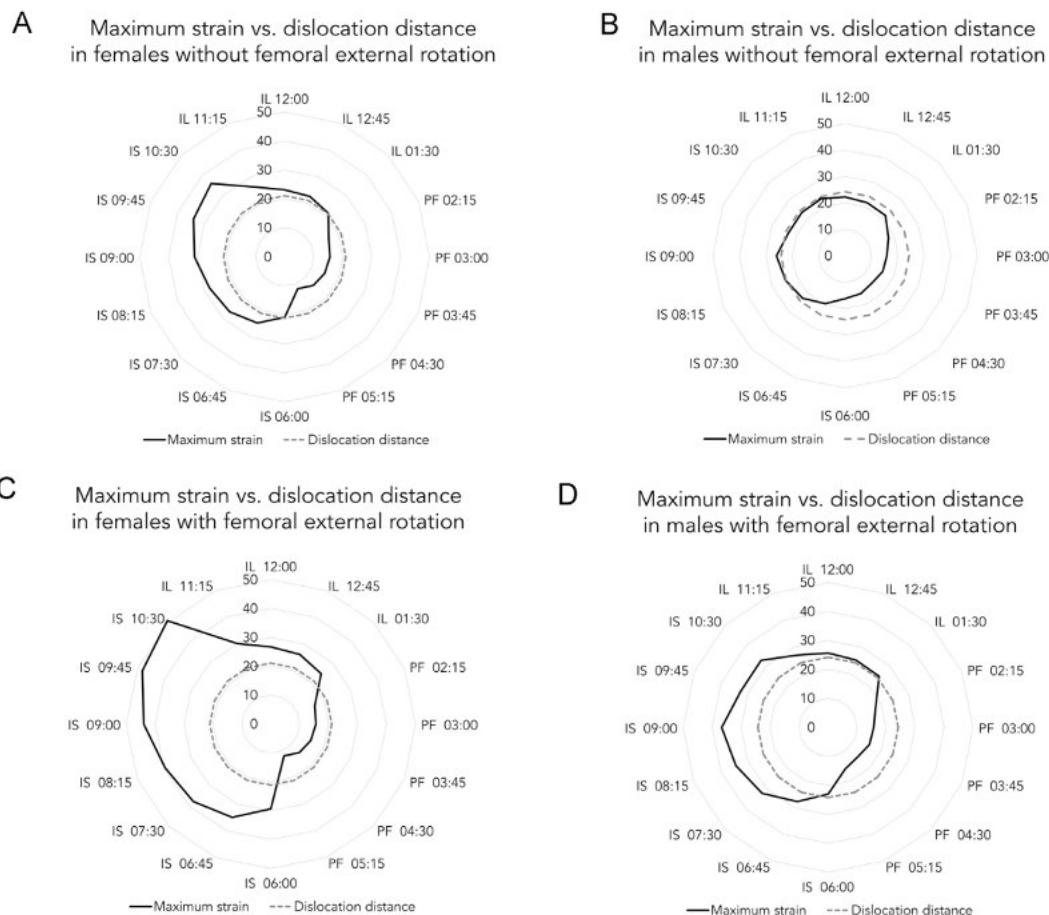


Fig. 3. Maximum strain (black line) vs. dislocation distance (gray dashed line) for the iliofemoral ligament (IL), ischiofemoral ligament (IS) and pubofemoral ligament (PF). (A) Females and (B) males with 0° external rotation for all ligaments, (C) Females and (D) males at an external rotation of 30° for the IL, 45° for the IS and 0° for the PF. IL and IS maximum strain exceeded the dislocation distance in females without external rotation and in both genders with external rotation, and always at the 7 to 1 o'clock position.

group (≥ 55 years, $n=16$). The elastic modulus was higher in the young group than in the old group for the IL (31.0 ± 22.5 vs. 18.3 ± 17.9 N/mm²) and the IS (27.4 ± 24.8 vs. 17.1 ± 15.4 N/mm²), but these differences were not significant ($p > 0.05$). PF elastic modulus was significantly higher in the young compared to the old with 35.9 ± 39.1 vs. 13.3 ± 10.7 N/mm² ($p=0.02$) respectively. Similarly ultimate stress was higher in the young than in the old for the IL ($13.1 \pm 9.1\%$ vs. $7.1 \pm 4.7\%$), the IS ($8.0 \pm 7.0\%$ vs. $7.4 \pm 7.0\%$), and the PF ($7.7 \pm 4.7\%$ vs. $5.3 \pm 3.2\%$), however the differences were non-significant ($p > 0.05$). Conversely, maximum strain of the IL was non-significantly lower in the young (81.0 ± 22.7 vs. 87.8 ± 45.7 N/mm²) and significantly lower for the IS (70.9 ± 26.5 vs. 102.2 ± 42.1 N/mm²; $p=0.02$) and the PF (60.3 ± 21.2 vs. 85.4 ± 39.1 N/mm²; $p=0.05$). Correlation analyses over the entire sample did not reveal any significant dependencies between the mechanical data and age, body weight or height.

3.4. Capsular ligament stiffness exceeds the threshold necessary for dislocation in females at 0° hip joint external rotation, and in both females and males at 30° and 45° external rotation

Comparison of IL, IS and PF maximum strain vs. the distance required for hip joint dislocation revealed gender- and angle-dependent results (Fig. 3). Without hip joint external rotation (0°), the IL and IS maximum strain exceeded the dislocation distance at the 6 to 1 o'clock position in females (Fig. 3A), but not in males (Fig. 3B). Calculations with the hip joint rotated externally showed that at angles of 30° and 45° the magnitude of potential dislocation increased to where the maximum strain exceeded the dislocation distance in females (Fig. 3C). The same effects were observed in males at these angles and at the same positions (Fig. 3D).

4. Discussion

The ligaments of the human hip joint are considered to be major mechanical stabilizers preventing dislocation. Hip joint stability relies upon the complex interplay between the bony congruency of the acetabulum and femur, the suction seal, the dynamic muscular forces, as well as capsular and ligamentous restraints (Myers et al., 2011; Smith et al., 2014). The surrounding muscles are known to be powerful limiters of dislocation (Heller et al., 2005). A number of different experimental setups have been utilized to examine hip joint ligament mechanics (Chiu et al., 2000; Kwon et al., 2006; McCormick et al., 2014; Prietzel et al., 2014b; Stewart et al., 2004). Previous biomechanical studies have suggested that the capsular ligaments reinforce other periarticular static soft-tissue stabilizers and the quasi-hemispheric acetabulum (Domb et al., 2013; Kohnlein et al., 2009; Torry et al., 2006). In this study we aimed at obtaining stress-strain data of the IL, IS and PF over an extended age range and to determine gender-, side- and age-related differences using fresh and anatomically unfixed tissues revisiting the results of our earlier study (Pieroh, 2016).

4.1. Tensile properties of the hip joint ligaments appear to be largely variable for the IL, IS and PF

In this study we could show that the stress-strain properties of the hip joint ligaments were largely variable and their mean values similar for their respective anatomical sites. Our hypothesis stating that tensile properties of the ligaments differ between the sites (I_A) and sides (I_B) consequently needs to be rejected. However, significant differences were found for the IS, having a higher elastic modulus and lower maximum strains in males compared to females, giving a tendency to accept the hypothesis I_C. Several groups have tested the

human hip joint ligaments mechanically using fresh (Hewitt et al., 2001, 2002; Ito et al., 2009; Smith et al., 2014; Stewart et al., 2002; Telleria et al., 2011), formaldehyde-fixed (Lohe et al., 1996) or ethanol-glycerin-fixed tissues (Pieroh, 2016). However, given the lack of standardization it is difficult to compare these data. Hewitt et al. found higher values for the elastic modulus of the IL (76 to 286 N/mm²) and the IS (81 to 100 N/mm²) in the samples from ten cadavers aged 50 years or older (Hewitt et al., 2001, 2002). Similarly, Stewart et al. reported mean elastic moduli of the entire capsule ranging between 110 and 186 N/mm² in their samples from five cadavers aged 68 years or older (Stewart et al., 2002). Such high elastic moduli could neither be found for the entire population ranging between 14 and 93 years, nor for the sample older than 50 years. The maximum strain and ultimate stress of the IL and IS obtained by Hewitt et al. were much lower than in our experiments (Hewitt et al., 2001, 2002), indicating that their samples may not have been tested perpendicular to the main fiber orientation. Comparison to our previous experiments with ethanol-glycerin fixed and rinsed samples (Pieroh, 2016), showed that elastic modulus increased, whereas maximum strain decreased. These results underline that ethanol-glycerin fixation causes irreversible changes in the soft tissues (Steinke et al., 2012), possibly by dehydration or proteoglycan washout. Previous reports on hip joint laxity being more predominant in females than in males (McCormick et al., 2014; Myers et al., 2011) can be confirmed by our results, especially in regards to the IS, revising the findings of our recent study (Pieroh, 2016).

4.2. There is evidence for the IS and PF to change age-dependently

It was been hypothesized that the hip joint ligaments undergo age-related changes in elasticity. The comparison between the two age groups (< 55 years and ≥ 55 years) revealed that there were significant decreases in PF elastic modulus, and significant increases in IS and PF maximum strain, providing evidence in favor of hypothesis II. However, no evidence for a linear change of IL, IS or PF elasticity could be found. Ageing is known to affect hip joint ligament mechanics (Frank et al., 1999; Fuss and Bacher, 1991; Hama et al., 1976; Helwig et al., 2013; Hewitt et al., 2001, 2002; Sato et al., 2012; Stewart et al., 2002). Ippolito et al. (1980) and Cotta (1961) found no changes in the collagen fibril diameter histologically and ultrastructurally in men. Moreover, comparison of the age-related changes of the hip joint ligaments to the changes occurring in the iliotibial tract are different (Hammer et al., 2012). The iliotibial tract undergoes age-related increases in stiffness (Hammer et al., 2012), whereas the hip joint ligaments appear to have decreased stiffness. The underlying mechanisms related to the changes leading to ligamentous loss of elasticity in the hip joint ligaments remains unclear.

4.3. The hip joint ligaments limit hip joint dislocation mechanically, but this mechanical restraint is minimized in external rotation

In a third hypothesis we investigated whether the hip joint ligaments may prevent dislocation passively due to an optimal ratio between ligament elasticity and length. Previously the mechanical properties of the IL and IS have been attributed to stabilizing effects (Elkins et al., 2011; Fessler, 1894; Fick, 1911). The IL being an important constraint of hip joint external rotation and anterior rotation (Myers et al., 2011). A recent study has shown that each of the capsular ligaments has a primary role in restraining hip joint rotation, exceeding the role of the ligamentum teres and the labrum as secondary constraints (van Arkel et al., 2015). The IL is known to have parallel-aligned collagen fiber bundles, whereas the IS consists of several layers including perpendicular orientations (Sato et al., 2012). Numerically it could be shown that the ligament stiffness-related dislocation-preventing

mechanism exists in males and in females at the attachment regions of the inferior IL and PF, preventing anterior and inferior hip joint dislocation in males at all times. However, the sites of the IS and the cranial attachments of the IL may not effectively prevent dislocation in females at 0°, and in both genders at 30° to 45° of external rotation. By using our numerical approach including mechanical data we could show that the spiral configuration of the hip joint ligaments may even facilitate hip joint dislocation, by unwrapping around the joint space, creating more space (Domb et al., 2013). These results confirm the findings of Smith et al. (2014) that the IL, IS and PF appear to act independently to resist the end-range motion of the hip. Our results give strong evidence that there might be additional hip-stabilizing mechanisms that the hip joint ligaments might be involved in beyond mechanical stiffness. First, given the existence of mechanoreceptors such as Ruffini bodies, Golgi and Vater Pacini corpuscles within the capsular ligaments of the hip joint (Moraes et al., 2011), the transverse acetabular ligament (Lohe et al., 1996) and the teres ligament of the hip joint (Dehao et al., 2015; Leunig et al., 2000; Moraes et al., 2011; Muratli et al., 2004), these mechanoreceptors are likely part of neuromuscular feedback loops. These loops could terminate at the small external rotators of the hip, but also at the larger muscles such as the gluteus maximus and the iliopsoas. Additionally, the effects of atmospheric pressure onto the joint might be an important stabilizing factor (Fick, 1911; Prietzel et al., 2008, 2014b, 2007; Wingstrand and Wingstrand, 1997; Wingstrand et al., 1990). The extended strain caused by the atmospheric pressure results in an extended strain of the hip joint ligaments once dislocation begins, as it constantly presses the soft tissues towards the joint cavity. This consideration was intentionally disregarded in our numerical analysis to provide evidence towards additional (passive) phenomena providing hip joint stability.

5. Clinical implications

There is a wide consensus that the ligaments of the hip joint play a crucial role in stabilizing the hip joint (Benali and Katthagen, 2009; Domb et al., 2013; Elkins et al., 2011; Hewitt et al., 2001, 2002; Ito et al., 2009; Matsuda, 2009; Mei-Dan et al., 2012; Mihalko and Whiteside, 2004; Myers et al., 2011; Nepple and Smith, 2015; Ranawat et al., 2009; Shindle et al., 2006; Shu and Safran, 2011; Stewart et al., 2002; Telleria et al., 2011; Torry et al., 2006). These stabilizing effects are of particular interest in total hip arthroplasty, as capsular resection is well known to increase the risk of dislocation (Delgado et al., 2013; Gaulrapp and Zimmermann, 2000; Hewitt et al., 2002; Kerschbaumer et al., 2007; Nepple and Smith, 2015). A decreased hip joint stability was repeatedly reported following capsular incision or removal (Chiu et al., 2000; Domb et al., 2013; Kwon et al., 2006; Liebenberg and Dommissie, 1969; Myers et al., 2011; Prietzel et al., 2014a; Stewart et al., 2004). Surgical techniques at the hip joint have therefore evolved from mere removal of the ligaments in favor of reconstructing them surgically, which has been proven to be advantageous, both clinically (Domb et al., 2013; Prietzel et al., 2014a) and experimentally (Elkins et al., 2011; Hewitt et al., 2001, 2002; Stewart et al., 2004). The given study could show that the hip-joint-stabilizing effects of the capsular ligaments are unlikely to only be the result of ligament stiffness, but also of additional phenomena such as atmospheric pressure. These results have strong additional implications towards capsular reconstruction following total hip arthroplasty (Domb et al., 2013; Prietzel et al., 2014a). Further investigations are required to resolve the complex

interplay of hip joint ligament elasticity, atmospheric pressure and neuromuscular loops.

6. Limitations

A number of limitations need to be addressed for this study. Larger sample sizes would have helped substantiate the differences, also to the effect of quantifying the observed differences to more extent. Cross-sections of the entire IL, IS and PF could not be evaluated from the samples provided, as this would have interfered with the measurement setup to obtain failure load data. Therefore comparisons between ligament lengths and dislocation distances were based on numerical estimations.

Conflict of interest statement

The authors have no conflict of interest related to this study.

Acknowledgments

The authors greatly acknowledge the gift of tissue donation in the context of this study, making it possible to provide greatly appreciated mechanical data of the young for the research community. We want to thank Robbie McPhee drawing the images, Matthias Oehme for his help with tissue preparation and Toni Wendler for his support during material testing. Casper Thorpe-Lewis proofread the paper as a native speaker.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomech.2016.09.001>.

References

- Benali, Y., Katthagen, B.D., 2009. Hip subluxation as a complication of arthroscopic debridement. *Arthroscopy* 25, 405–407.
- Burroughs, B.R., Hallstrom, B., Golladay, G.J., Hoeffel, D., Harris, W.H., 2005. Range of motion and stability in total hip arthroplasty with 28-, 32-, 38-, and 44-mm femoral head sizes. *J. Arthroplast.* 20, 11–19.
- Chiu, F.Y., Chen, C.M., Chung, T.Y., Lo, W.H., Chen, T.H., 2000. The effect of posterior capsulorrhaphy in primary total hip arthroplasty: a prospective randomized study. *J. Arthroplast.* 15, 194–199.
- Cotta H., Elektronenoptische Untersuchungen über das Bindegewebe der Gelenk-kapsel. I. Mitteilung: Das Fibrillensystem *Z. Orthop.* 94 1960,1.
- Dehao, B.W., Bing, T.K., Young, J.L., 2015. Understanding the ligamentum teres of the hip: a histological study. *Acta Orthop. Bras.* 23, 29–33.
- Delgado, F.G., Broch, A., Reina, F., Ximeno, L., Torras, D., Garcia, F., Salvador, A., 2013. MAASH technique for total hip arthroplasty: a capsular work. *HSS J.* 9, 171–179.
- Domb, B.G., Philippon, M.J., Giordano, B.D., 2013. Arthroscopic capsulotomy, capsular repair, and capsular plication of the hip: relation to atraumatic instability. *Arthroscopy* 29, 162–173.
- Elkins, J.M., Stroud, N.J., Rudert, M.J., Tochigi, Y., Pedersen, D.R., Ellis, B.J., Callaghan, J.J., Weiss, J.A., Brown, T.D., 2011. The capsule's contribution to total hip construct stability—a finite element analysis. *J. Orthop. Res.* 29, 1642–1648.
- Fessler, J., 1894. Die Festigkeit der menschlichen Gelenke mit besonderer Berücksichtigung des Bandapparates, Habilitationsschrift, Königlich Bayerische Ludwig-Maximilians-Universität, München.
- Fick, R., 1911. *Handbuch der Anatomie und Mechanik der Gelenke*. Gustav Fischer, Jena, 461–511.
- Frank, C.B., Hart, D.A., Shrive, N.G., 1999. Molecular biology and biomechanics of normal and healing ligaments—a review. *Osteoarthritis Cartil.* 7, 130–140.
- Fuss, F.K., Bacher, A., 1991. New aspects of the morphology and function of the human hip joint ligaments. *Am. J. Anat.* 192, 1–13.

- Gaulrapp, H., Zimmermann, T., 2000. Sonographic changes after total hip joint replacement. *Ultraschall Med.* 21, 122–127.
- Hama, H., Yamamoto, T., Takeda, T., 1976. Experimental studies on connective tissue of the capsular ligament. Influences of aging and sex hormones. *Acta Orthop. Scand.* 47, 473–479.
- Hammer, N., Huster, D., Boldt, A., Hadrich, C., Koch, H., Mobius, R., Schulze-Tanzil, G., Scheidt, H.A., 2016. A preliminary technical study on sodium dodecyl sulfate-induced changes of the nano-structural and macro-mechanical properties in human iliotibial tract specimens. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 61, 164–173.
- Hammer, N., Huster, D., Fritsch, S., Hadrich, C., Koch, H., Schmidt, P., Sichtung, F., Wagner, M.F., Boldt, A., 2014. Do cells contribute to tendon and ligament biomechanics? *PLoS One* 9, e105037.
- Hammer, N., Lingslebe, U., Aust, G., Milani, T.L., Hadrich, C., Steinke, H., 2012. Ultimate stress and age-dependent deformation characteristics of the iliotibial tract. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 16, 81–86.
- Heller, M.O., Bergmann, G., Kassir, J.P., Claes, L., Haas, N.P., Duda, G.N., 2005. Determination of muscle loading at the hip joint for use in pre-clinical testing. *J. Biomech.* 38, 1155–1163.
- Helwig, P., Hindenlang, U., Hirschmüller, A., Konstantinidis, L., Sudkamp, N., Schneider, R., 2013. A femoral model with all relevant muscles and hip capsule ligaments. *Comput. Methods Biomech. Biomed. Eng.* 16, 669–677.
- Hewitt, J., Guilak, F., Glisson, R., Vail, T.P., 2001. Regional material properties of the human hip joint capsule ligaments. *J. Orthop. Res.* 19, 359–364.
- Hewitt, J.D., Glisson, R.R., Guilak, F., Vail, T.P., 2002. The mechanical properties of the human hip capsule ligaments. *J. Arthroplast.* 17, 82–89.
- Ippolito, E., Ishii, Y., Ponseti, I.V., 1980. Histologic, histochemical, and ultrastructural studies of the hip joint capsule and ligamentum teres in congenital dislocation of the hip. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 246–258.
- Ito, H., Song, Y., Lindsey, D.P., Safran, M.R., Giori, N.J., 2009. The proximal hip joint capsule and the zona orbicularis contribute to hip joint stability in distraction. *J. Orthop. Res.* 27, 989–995.
- Kerschbaumer, F., Kerschbaumer, G., Deghani, F., 2007. Is a dorsal access associated with an elevated luxation rate following total hip replacement? *Orthopäde* 36, 928–932 934.
- Kohnlein, W., Ganz, R., Impellizzeri, F.M., Leunig, M., 2009. Acetabular morphology: implications for joint-preserving surgery. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 467, 682–691.
- Kwon, M.S., Kuskowski, M., Mulholland, K.J., Macaulay, W., Brown, T.E., Saleh, K.J., 2006. Does surgical approach affect total hip arthroplasty dislocation rates? *Clin. Orthop. Relat. Res.* 447, 34–38.
- Lanz, T., Lang, J., 2004. Bein und Statik. *Praktische Anatomie, Klassiker der Medizin*, 2., neubearb. Aufl., Sonderausg., ed. pp. XIV, 473 S.
- Leunig, M., Beck, M., Stauffer, E., Hertel, R., Ganz, R., 2000. Free nerve endings in the ligamentum capitis femoris. *Acta Orthop. Scand.* 71, 452–454.
- Liebenberg, F., Dommissie, G.F., 1969. Recurrent post-traumatic dislocation of the hip. *J. Bone Jt. Surg. Br.* 51, 632–637.
- Lohe, F., Eckstein, F., Sauer, T., Putz, R., 1996. Structure, strain and function of the transverse acetabular ligament. *Acta Anat.* 157, 315–323.
- Matsuda, D.K., 2009. Acute iatrogenic dislocation following hip impingement arthroscopic surgery. *Arthroscopy* 25, 400–404.
- McCormick, F., Slikker 3rd, W., Harris, J.D., Gupta, A.K., Abrams, G.D., Frank, J., Bach Jr., B.R., Nho, S.J., 2014. Evidence of capsular defect following hip arthroscopy. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 22, 902–905.
- Mei-Dan, O., McConkey, M.O., Brick, M., 2012. Catastrophic failure of hip arthroscopy due to iatrogenic instability: can partial division of the ligamentum teres and iliofemoral ligament cause subluxation? *Arthroscopy* 28, 440–445.
- Mihalko, W.M., Whiteside, L.A., 2004. Hip mechanics after posterior structure repair in total hip arthroplasty. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 194–198.
- Milner, G.R., Bolden, J.L., 2012. Humeral and femoral head diameters in recent white American skeletons. *J. Forensic Sci.* 57, 35–40.
- Moraes, M.R., Cavalcante, M.L., Leite, J.A., Macedo, J.N., Sampaio, M.L., Jamaru, V.F., Santana, M.G., 2011. The characteristics of the mechanoreceptors of the hip with arthrosis. *J. Orthop. Surg. Res.* 6, 58.
- Muratli, H.H., Bicimoglu, A., Tabak, Y.A., Celebi, L., Paker, I., 2004. Mechanoreceptor evaluation of hip joint capsule and ligamentum capitis femoris in developmental hip dysplasia: a preliminary study. *J. Pediatr. Orthop. B* 13, 299–302.
- Myers, C.A., Register, B.C., Lertwanich, P., Egnisman, L., Pennington, W.W., Giphart, J.E., LaPrade, R.F., Philippon, M.J., 2011. Role of the acetabular labrum and the iliofemoral ligament in hip stability: an in vitro biplane fluoroscopy study. *Am. J. Sports Med.* 39 (Suppl.), 855–915.
- Nepple, J.J., Smith, M.V., 2015. Biomechanics of the hip capsule and capsule management strategies in hip arthroscopy. *Sports Med. Arthrosc.* 23, 164–168.
- Parsegian, V.A., Rand, R.P., Rau, D.C., 1995. Macromolecules and water: probing with osmotic stress. *Methods Enzymol.* 259, 43–94.
- Pieroh, P.S., S., Lingslebe, U., Sichtung, F., Wolfskämpf, T., Josten, C., Böhme, J., Hammer, N., Steinke, H., 2016. The stress-strain data of the hip capsule ligaments are gender- and side independent suggesting a smaller contribution to passive stiffness. *PLoS One*, in preparation.
- Prietz, T., Drummer, N., Pilz, D., Richter, K.W., Salis-Soglio, G., 2008. Webers experiments regarding the stabilising effect of atmospheric pressure on the hip joint—a historical and experimental retrospect. *Z. Orthop. Unf.* 146, 644–650.
- Prietz, T., Hammer, N., Schleifenbaum, S., Adler, D., Pretzsch, M., Kohler, L., Petermann, M., Farag, M., Panzer, S., Bauer, S., von Salis-Soglio, G., 2014a. The impact of capsular repair on the dislocation rate after primary total hip arthroplasty: a retrospective analysis of 1972 cases. *Z. Orthop. Unf.* 152, 130–143.
- Prietz, T., Hammer, N., Schleifenbaum, S., Kassebaum, E., Farag, M., von Salis-Soglio, G., 2014b. On the permanent hip-stabilizing effect of atmospheric pressure. *J. Biomech.* 47, 2660–2665.
- Prietz, T., Richter, K.W., Pilz, D., von Salis-Soglio, G., 2007. The stabilizing effect of atmospheric pressure (AP) on hip joint subject to traction force—an experimental study. *Z. Orthop. Unf.* 145, 468–475.
- Ranawat, A.S., McClincy, M., Sekiya, J.K., 2009. Anterior dislocation of the hip after arthroscopy in a patient with capsular laxity of the hip. A case report. *J. Bone Jt. Surg. Am.* 91, 192–197.
- Sato, K., Uchiyama, E., Katayose, M., Fujimiyama, M., 2012. Microscopic analysis of the iliofemoral and ischiofemoral ligaments in the hip joint: collagen fiber direction and crimp distribution. *Anat. Sci. Int.* 87, 50–55.
- Schleifenbaum, S., Prietz, T., Aust, G., Boldt, A., Fritsch, S., Keil, I., Koch, H., Mobius, R., Scheidt, H.A., Wagner, M.F., Hammer, N., 2016. Acellularization-induced changes in tensile properties are organ specific—an in-vitro mechanical and structural analysis of porcine soft tissues. *PLoS One* 11, e0151223.
- Shindle, M.K., Ranawat, A.S., Kelly, B.T., 2006. Diagnosis and management of traumatic and atraumatic hip instability in the athletic patient. *Clin. Sports Med.* 25, 309–326 ix-x.
- Shu, B., Safran, M.R., 2011. Hip instability: anatomic and clinical considerations of traumatic and atraumatic instability. *Clin. Sports Med.* 30, 349–367.
- Sichtung, F., Steinke, H., Wagner, M.F., Fritsch, S., Hadrich, C., Hammer, N., 2015. Quantification of material slippage in the iliotibial tract when applying the partial plastination clamping technique. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 49, 112–117.
- Smith, M.V., Costic, R.S., Allaire, R., Schilling, P.L., Sekiya, J.K., 2014. A biomechanical analysis of the soft tissue and osseous constraints of the hip joint. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 22, 946–952.
- Sobotta, J., Putz, R., 2004. *Atlas der Anatomie des Menschen: 116 Tabellen; [der komplette Atlas in einem Band] 21., neu bearb. Aufl. in einem Bd. Jubiläums-Ausg., limitierte (Ed.). 2004. Elsevier, München u.a.*
- Steinke, H., Lingslebe, U., Bohme, J., Slowik, V., Shim, V., Hadrich, C., Hammer, N., 2012. Deformation behavior of the iliotibial tract under different states of fixation. *Med. Eng. Phys.* 34, 1221–1227.
- Stewart, K.J., Edmonds-Wilson, R.H., Brand, R.A., Brown, T.D., 2002. Spatial distribution of hip capsule structural and material properties. *J. Biomech.* 35, 1491–1498.
- Stewart, K.J., Pedersen, D.R., Callaghan, J.J., Brown, T.D., 2004. Implementing capsule representation in a total hip dislocation finite element model. *Iowa Orthop. J.* 24, 1–8.
- Telleria, J.J., Lindsey, D.P., Giori, N.J., Safran, M.R., 2011. An anatomic arthroscopic description of the hip capsular ligaments for the hip arthroscopist. *Arthroscopy* 27, 628–636.
- Torry, M.R., Schenker, M.L., Martin, H.D., Hogoboom, D., Philippon, M.J., 2006. Neuromuscular hip biomechanics and pathology in the athlete. *Clin. Sports Med.* 25, 179–197, vii.
- van Arkel, R.J., Amis, A.A., Cobb, J.P., Jeffers, J.R., 2015. The capsular ligaments provide more hip rotational restraint than the acetabular labrum and the ligamentum teres: an experimental study. *Bone Jt. J.* 97-B, 484–491.
- Walters, B.L., Cooper, J.H., Rodriguez, J.A., 2014. New findings in hip capsular anatomy: dimensions of capsular thickness and pericapsular contributions. *Arthroscopy* 30, 1235–1245.
- Weidner, J., Buchler, L., Beck, M., 2012. Hip capsule dimensions in patients with femoroacetabular impingement: a pilot study. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 470, 3306–3312.
- Wingstrand, H., Wingstrand, A., 1997. Biomechanics of the hip joint capsule—a mathematical model and clinical implications. *Clin. Biomech.* 12, 273–280.
- Wingstrand, H., Wingstrand, A., Krantz, P., 1990. Intracapsular and atmospheric pressure in the dynamics and stability of the hip. A biomechanical study. *Acta Orthop. Scand.* 61, 231–235.
- Zernia, G., Huster, D., 2006. Collagen dynamics in articular cartilage under osmotic pressure. *NMR Biomed.* 19, 1010–1019.

3.2 Load and failure behavior of human muscle samples in the context of proximal femur replacement

S.Schleifenbaum¹, M.Schmidt¹, R. Möbius, T. Wolfskämpf, C. Schröder, R. Grunert, N. Hammer, T. Prietzel

¹ These authors have contributed equally to this work.

BMC Musculoskeletal Disorders 4/2016

In dieser Studie wurden die mechanischen Eigenschaften untersucht, die bei der nativen Knochen-Muskel-Verbindung bzw. bei angenähter Muskulatur an einen Trevira®-Anbindungsschlauch auftreten. Die mechanischen Untersuchungen ergaben eine signifikant höhere Versagenslast der nativen Verbindung im Vergleich zu der künstlichen Anbindung. Im Versagensverhalten stellten sich keine Unterschiede ein, und das Versagen trat bei beiden Anbindungsvarianten im Bereich der Muskulatur und nicht an der Anbindungsstelle auf. Die Naht führte somit nicht zu einer Schwächung des Gewebes. Außerdem konnte eine Datengrundlage für alternative Anbindungstechniken erzeugt werden.

Die ermittelten Ergebnisse der Ausreißversuche dienen einem besseren Verständnis für das Versagensverhalten der getesteten Anbindungen.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Load and failure behavior of human muscle samples in the context of proximal femur replacement

Stefan Schleifenbaum^{1†}, Michael Schmidt^{1†}, Robert Möbius², Thomas Wolfskämpf², Christian Schröder³, Ronny Grunert⁴, Niels Hammer^{5*†} and Torsten Prietzel^{1†}

Abstract

Background: To ensure adequate function after orthopedic tumor reconstruction, it is important to reattach the remaining soft tissue to the implant. This study aimed at obtaining mechanical properties of textile muscle-implant and muscle-bone connections in a preliminary test.

Methods: Two groups of soft-tissue attachment were mechanically tested and compared: Native bone-muscle samples obtained from human femora and muscles attached to a prosthetic implant by means of Trevira® attachment tubes. Additionally, muscle samples were tested with muscle fibers aligned parallel and perpendicular to the tension load. A uniaxial load was exerted upon all samples.

Results: Failure loads of 26.7 ± 8.8 N were observed for the native bone-muscle group and of 18.1 ± 9.9 N for the Trevira® group. Elongations of 94.8 ± 36.2 % were observed for the native bone-muscle group and 79.3 ± 51.8 % for the Trevira® group. The location of failure was mainly observed in the central area of the muscle fibers. Muscle fibers with parallel fiber orientation (47.6 ± 11.5 N) yielded higher tensile strength than those with perpendicular fiber orientation (14.8 ± 4.1 N).

Conclusions: Our experiments showed that higher forces were transmitted in the origin and insertion areas than in areas of flat soft tissue reconstruction using attachment tubes. The data indicate that the tested material allows reattaching muscles, but without reinforcing the insertion site. Therefore, attachment tubes with region-dependent and potentially anisotropic material behavior might be advantageous to optimize muscle-bone load transmission after surgery, which may allow lower complication rates and shorter physical recovery.

Keywords: Mechanical properties, Muscle-bone connection, Muscle-attachment tubes, Proximal femoral reconstruction, Tumor orthopedic

Background

Modular tumor prostheses allow for limb-sparing techniques in the curative treatment of most primary malignant bone tumors. Prosthetic reconstruction may also help maintain or regain mobility in palliative cases involving bone metastasis. Modular prostheses are commonly used for bone and joint reconstruction [1–3],

making it possible to avoid amputation in the majority of cases. After the resection of the invaded parts of the bones and joints, orthopedic surgery aims at restoring joint and muscle function to resemble the healthy state as closely as possible. With this goal in mind, to enhance postoperative stability and to avoid complications, it is essential to reattach the remaining muscles, tendons, ligaments and aponeuroses to the tumor prosthesis, creating a load-bearing compound [4, 5]. Available tumor prosthesis systems, however, only provide limited sites for soft tissue reattachment. The soft tissue connection reached by suture and eyelets is often unsatisfactory [6]. The resulting gap, potentially containing hematoseroma, increases the risk of infection through bacterial

* Correspondence: nlshammer@googlemail.com

Stefan Schleifenbaum and Michael Schmidt contributed equally to this publication.

Niels Hammer and Torsten Prietzel contributed equally to this publication.

[†]Equal contributors

⁵Department of Anatomy, University of Otago, Lindo Ferguson Building, 270 Great King St., Dunedin 9016, New Zealand

Full list of author information is available at the end of the article



© 2016 Schleifenbaum et al. **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

colonization [5, 7–10]. An alternative fixation of the soft tissues can be accomplished by suturing them onto the tumor prosthesis by means of attachment tubes. Attachment tubes enable a stable muscle connection on the whole tumor prosthesis by primary suture as well as secondary scar tissue ingrowth [4, 11–13]. One of the main fields of application of such tube-like implants is the region of the proximal femur (Fig. 1). Here, the gluteus and the vastus muscle groups can be reattached following extensive bone removal [1].

However, the acting forces and failure mechanisms in the muscle-implant interface have only been investigated to a limited extent. Existing research mainly focuses on the origin and attachment of muscles. Such data could help establish an objective basis for further development of current connection systems. This study aimed at collecting data on mechanical load and failure behavior of textile muscle-implant connections and compared these data to native muscle-bone connections. Furthermore, this study aimed at analyzing the influence of muscle fiber orientation on strain and failure behavior, which is well established using animal-based data [14, 15], but has not been shown using human tissue.

The following hypotheses were examined:

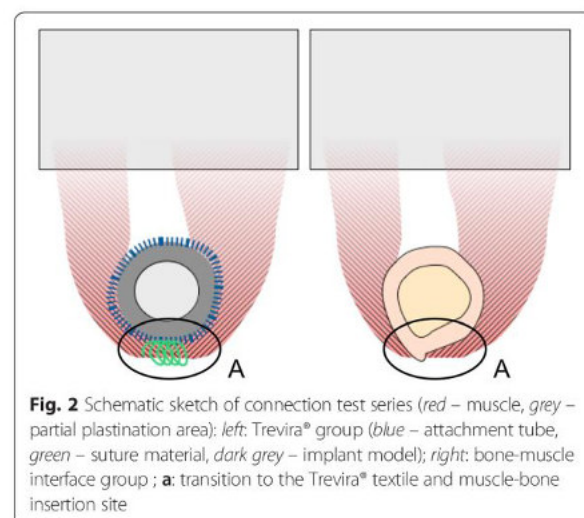
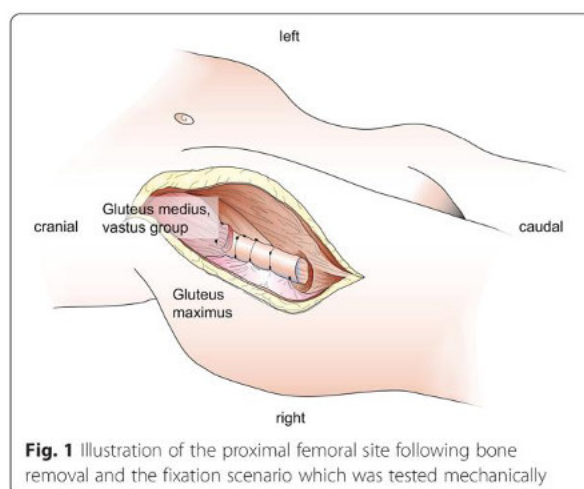
- (1) Artificial connections between muscles and attachment tubes withstand a comparable level of tensile forces and strain as the native muscle-bone connections.
- (2) Passive tensile material properties of human muscle tissue are strongly dependent on the fiber direction.

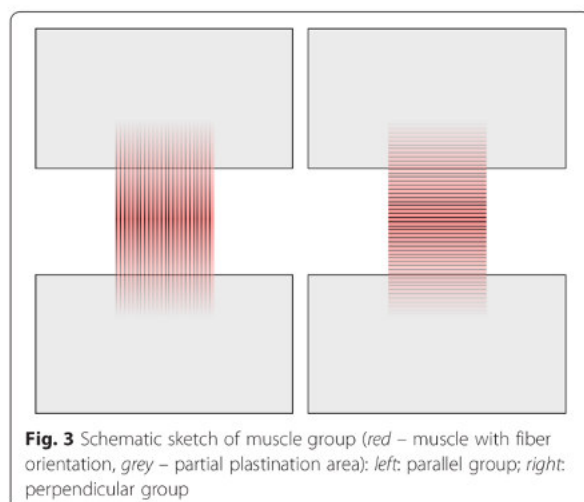
Methods

Sample acquisition and preparation

The quadriceps femoris muscle and the adjacent femur were removed from two body donors (A: 90 year-old

male B: 66 year-old male; Fig. 1) at the Institute of Anatomy, University of Leipzig, Germany. While alive, the donors gave their informed and written consent to the post-mortem donation of their bodies for teaching and research purposes. Being part of the body donor program regulated by the Saxonian Death and Funeral Act of 1994 (third section, paragraph 18 item 8), institutional approval for the use of the post-mortem tissues of human body donors was obtained from the Institute of Anatomy, University of Leipzig. The authors declare that all experiments have been conducted according to the principles of the Declaration of Helsinki. The donors had no history of connective tissue disease and the tissues were removed in a fresh and chemically-unfixed condition with a post-mortem delay of less than 24 h. The muscle samples were processed in a condition without rigor mortis [16]. The femora and muscles were immediately moistened with isotonic sodium chloride solution, precooled at 3 °C and shock frozen at −85 °C. Sixty-five serial sections of the muscles and bones of 30 mm thickness were obtained from the donors (A: 32 and B: 33 sections). The samples were randomly assigned to one of the following two test series: a connection test series and a muscle test series. The connection test series (Fig. 2) was further subdivided into a bone-muscle interface group and a Trevira® group, each consisting of 17 samples. The muscle test series (Fig. 3) was further subdivided into a parallel group and a perpendicular group, according to the muscle fiber orientation in relation to the force vector. The muscle group consisted of 15 samples in parallel direction and 16 samples in perpendicular direction. In all subgroups the muscle ends were partially plastinated.





Partial plastination technique

The ends of the muscle and muscle-bone samples were freeze-substituted in acetone and primed with polyurethane resin in a ratio of 1/1/3 with RENCAST FC52 Isocyanate/FC52 Polyol/Ceramic Powder (RenShape solutions, Huntsman International LLC, Salt Lake City, USA;). The resin was reinforced with Pertinax plates (PF CP 201, Dr. Müller GmbH, Ahlhorn, Germany) to improve the stability of the plastinated parts for clamping in the material testing machine (Figs. 2 and 3). After polymerization of the resin, the samples were rinsed in 40 °C water to remove the gelatin. The central parts of the samples remained in an anatomically unfixed and fresh condition at all times. The resulting samples measured 20 or more millimeters in length and 14 or more millimeters in width. For more details on the partial plastination technique, please refer to [17] and [18]. For further storage prior to the mechanical testing, the samples were immediately precooled at 3 °C and shock frozen at -85 °C. This approach prevented the formation of ice needles, potentially influencing material properties [16, 19].

Mechanical testing

The samples that were used for the Trevira® group in the connection test series were dissected immediately prior to the tensile tests. The muscle tissue surrounding the bone was severed from the aponeurosis and detached along the bone. Subsequently a 40-mm long piece of textile tube connection made of polyethylene terephthalate with a diameter of 35 mm (Trevira®, Implantcast, Buxtehude, Germany) was put on a steel cylinder with a diameter of 30 mm. The previously detached muscle endings were laid around the textile and stitched using a standardized double knot technique according to the intraoperative standard operating procedure [20]. As

suture material, polyester stitches (Mersilene® 3, Somerville, NJ, USA) were used. The muscle samples were tapered in their central part prior to the mechanical tensile testing.

Uniaxial tensile tests were obtained from all muscle samples (Fig. 4). On the day of testing, the samples were defrosted for two hours in isotonic sodium chloride solution (37 °C) and were immediately taken out for testing. The tensile tests were performed using an electro-mechanical testing machine (Typ 5566A, Instron, Norwood, MA, USA), a 1 kN load cell and the software for data acquisition on the basis of a speckle pattern sprayed on the samples (Blue Hill 2.0, Instron, Norwood, MA, USA). The plastinated ends of the samples were clamped between the jaws. For further standardization, a pretension of 3 N was set and then the cross-section of the sample was measured with a caliper. Specimen dimensions were obtained individually for each sample before the testing started. For this purpose a reference image was made with camera system (Limess Meßtechnik und Software GmbH, Krefeld, Germany). The testing velocity was 20 mm/min with a sampling rate of 10 Hz, according to data previously published elsewhere [18, 21]. For qualitative failure localization, the camera system was recorded during the test with a sample rate of 5 Hz.

Data processing and statistical analysis

The stress-strain values were computed using MATLAB 2011 (Mathworks, Natick, MA, USA). The elastic modulus was calculated with the secant modulus and the elongation with Cauchy-elongation. Elastic modulus, ultimate strain (F_{Max} [N]) and elongation (ϵ_{FMax} [%]) during the maximum strain were calculated on the basis of the stress-strain data for the muscle test series. For the connection test series, only the ultimate strain (F_{Max} [N]) and elongation (ϵ_{FMax} [%]) were calculated. Statistical comparison of the data was performed using the SPSS 20.0 software (IBM, IL, USA). The Kolmogorov-Smirnov test (KS) was used to determine normal distribution of the data, followed by the Mann-Whitney U-test. *P*-values of 0.05 or less were considered being statistically significant.

The digital image analysis data were exclusively used for the qualitative localization of the failure site. Therefore, two major areas were distinguished in the samples: Proximity to the muscle-bone insertion site of attachment or the textile (failure location A, Fig. 2) and in the central/neutral muscle area (failure location B).

Results

Stress-strain data of 62 samples were obtained. Data of three samples were excluded: one sample in the bone-muscle group, one in the Trevira® group and one in the

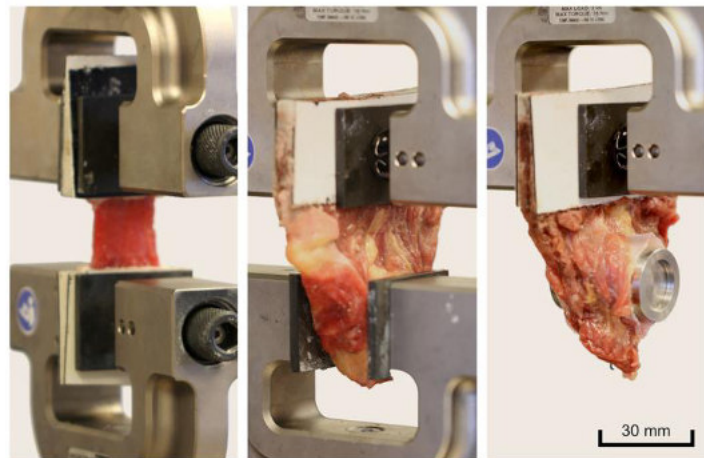


Fig. 4 Experimental setup with three different sample types: *Left*: Alignment of the muscle fibers parallel to the tension load, *Middle*: The bone was attached at the lower clamp while the plastinated muscle end was clamped on top, *Right*: The connection tube was pulled over the metallic cylinder, while the sutures that connect the muscle to the tube were aligned downwards to the cylinder

perpendicular muscle group due to material slippage and failure outside the tapered area.

Connection test series

The primary location of failure was in the central area of 87.5 % of the muscle bone and Trevira® groups, as indicated by the camera system. In the remaining 12.5 % (Fig. 2a), the failure site was located in proximity to the muscle-bone insertion site or at the transition to the Trevira® textile. In the bone-muscle group, a mean maximum force of 26.7 ± 8.8 N (mean \pm standard deviation) and a strain under maximum force absorption $\epsilon_{F_{max}}$ of 94.8 ± 36.2 % were recorded. In the Trevira® group, F_{max} was 18.1 ± 9.9 N and $\epsilon_{F_{max}}$ was 79.3 ± 51.8 % ($p = 0.026$; $p = 0.379$, Fig. 5). Load-to-failure graphs are exemplarily shown in Fig. 6.

Muscle test series

In both muscle groups, the primary failure site was found in the central area of the samples, regardless of the fiber orientation. Muscle samples with fiber orientation parallel to the strain direction yielded significantly higher maximum forces of 47.6 ± 11.5 N, as compared to the samples with perpendicular fiber orientation, averaging of 14.8 ± 4.1 N ($p < 0.001$). The strain during the maximum force absorption was 66.4 ± 27.6 % (parallel) and 52.6 ± 27.1 % (perpendicular), differing to a non-statistically significant level ($p = 0.186$; Fig. 7). Elastic moduli of 26.6 ± 14.0 kPa (parallel) and 10.6 ± 5.2 kPa (perpendicular) were derived. Load-to-failure graphs are exemplarily shown in Fig. 8.

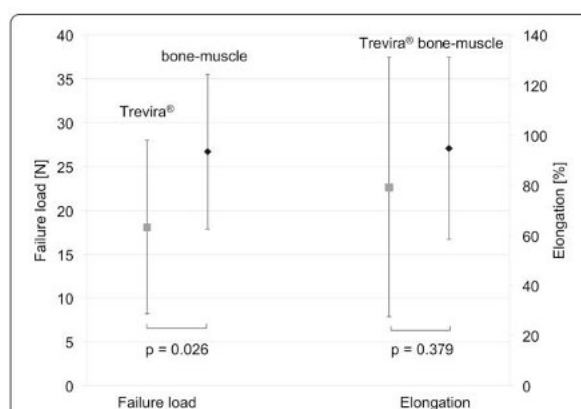


Fig. 5 Mechanical data of failure load and elongation for the connection test series (Trevira® and bone-muscle groups)

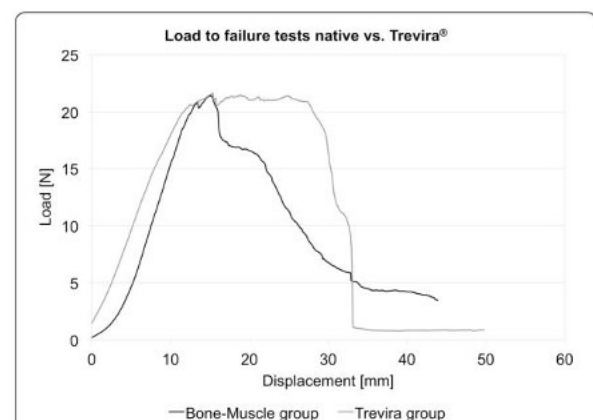
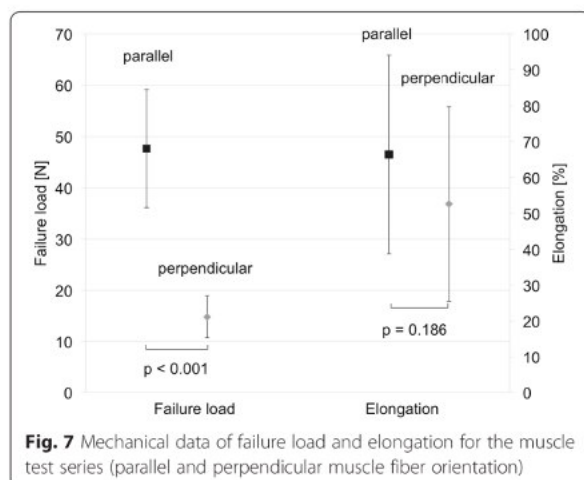


Fig. 6 Representative example of failure load graphs for the native bone-muscle group and for the Trevira® group



Discussion

The Trevira® group showed significantly lower failure loads than the muscle-bone group while undergoing passive strain

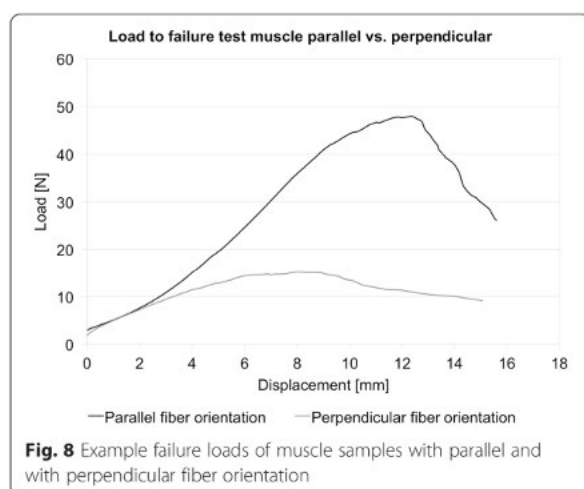
This study examined the failure mechanisms of human muscle samples, depending on the type of attachment chosen for soft tissue reconstruction. The principal aim was to determine to what extent the strain that soft tissue attached to tumor prosthesis by means of textile connections resembles the strain withstood by native muscle-bone attachments in similar scenarios. Furthermore, for comparative purposes, mechanical tensile load-strain values of human post-mortem muscle tissue were collected in the context of fiber orientation. The samples of the Trevira® group showed significantly lower failure loads than the muscle-bone group, indicating that the removal of the original muscle attachment decreases the strength of the connection interface as well. These findings coincide with literature in which artificially

reconstructed joint structures show a significantly lower strength than the physiological structures [22]. Hypothesis 1 therefore has to be rejected on the basis of the tensile data obtained in our study. Furthermore, high variances were observed in the strain data by the Trevira® and muscle-bone group. Possible reasons for this finding were the regionally different tissue properties of muscles obtained from the femur of the body donors. Also the strain may be influenced by the by different ages of the two subjects [23]. The location of failure was almost exclusively in the region of the muscle tissue. Surprisingly, tears were found at the connection site or at the transition between muscle and textile in 10 % of all cases. These findings suggest that the reattachment through sutures reinforces the muscle tissue, promoting material failure outside of the region of the suture. The existing literature shows higher tensile strength and elasticity in ligaments and tendons [17, 24, 25] than the muscle samples in our study. Artificial textile connections are also likely to have significantly higher tensile strengths [26, 27].

Passive tensile strength of muscle samples is orientation-dependent concerning the passive properties of muscle fibers

The highest tensile strength was found when a load was applied parallel to muscle fiber orientation, corresponding to the natural stress direction within the muscle tissue. Significantly higher forces could be absorbed in fibers aligned parallel to the strain vector, as compared to the perpendicular fiber orientation. This might be due to the fact that the muscles were also subject to tensile stress during physiological contraction [28–30]. However, this observation is limited to the passive mechanical properties of muscles. The elastic moduli obtained from the muscle samples with parallel fiber orientation were similar to the values obtained by Kot and co-workers [31], with minor differences likely attributable to the freeze thawing cycles causing a decrease of approximately 40 % [19]. Hypothesis two can therefore be accepted. Similar findings have been obtained in muscle samples of pigs [14, 15], whereas our study used muscle samples from humans.

A trend to higher elongations was observed in muscle samples with parallel fiber orientation as compared to muscle samples being strained perpendicularly to the fiber orientation. The highest elongation values were found in the parallel muscle group. It is known that in physiological contraction muscle fibers shorten to a varying extent, depending on the joint angle and their pennation angles [29, 30, 32]. Simultaneously occurring shear loads in the region of the bony attachments might be the reason for a significantly higher maximum elongation in the parallel direction [28, 33, 34]. Additionally,



the insertion of suture materials seems to significantly reduce the strain, as compared to physiological connections. This might potentially be related to the sawing effects of the sutures.

Clinical implications for the attachment of muscles in tumor surgery

A major issue in orthopedic surgery is to create a highly durable surgical connection of biological tissues to textile tubes. This can probably only be realized with altered material properties. It would therefore be of interest to construct connection tubes or soft tissue connections with region-dependent and potentially anisotropic material properties. In the case of soft tissues used to create a laminar biological connection, it would be important to have large elongation properties for the muscle contraction in order to minimize strains at the connection site. In the case of muscles being directly attached to the endoprotheses, it would be important to reinforce the connection, thus increasing material stiffness and allowing the transfer of large tensile forces during the muscle contraction and joint movement [31]. A differentiated soft tissue attachment tube may offer a lower complication rate and shorter postoperative rehabilitation times for the patient until full range active joint motion is re-established. This would lead to a significantly shortened rehabilitation phase of patients after tumor or revision surgery. In future, soft tissue connection should therefore be developed for tumor prosthesis to achieve a reconstruction that is as close as possible to the original anatomical system and better for the surgical approaches. In view of increasing life expectancy in patients with malignant bone and soft tissue tumors [35], earlier exercise and thus mobilization of the diseased joint would decrease the risk for general postoperative complications. The regained mobility would also result in a tremendous increase in quality of life for patients.

Limitations

The testing at it stands does not entirely resemble physiological mechanisms of load but it represents the current standard of testing biological tissues. The muscles were subjected to passive strain, which is significantly different from active contraction concerning the forces exerted upon the extracellular matrix. Muscles and tendons are known to merge with the collagen type of the osseous periosteum by means of Sharpey fibers [36]. As the uniaxial strain exerted to this transition may be considered unphysiological, material failure related to avulsion phenomena are likely to happen. However, in most of the muscle samples, material failure was observed in the central part of the sample, indicating that this error only had a limited effect. Though the given tests are based on a small sample size and simplify

physiological strain *in vivo*, they allow a comparison under standardized conditions between the different connection types. Moreover, in existing literature, a simplified representation of muscle origin and insertion is also commonly used [28, 33]. Therefore, our setup appears to be valid. Moreover, it is important to point out that the bone-muscle and Trevira® samples showed scattered fiber orientations. Freezing the samples for storage might have influenced the material properties [19]. The suture of the muscles to the bones and/or attachment tubes will also likely impact the material properties of the compound [37]. However, this error may be regarded as systematic in our setup. Further limitations encompass potential effects of material slippage and estimating the samples' cross-sections on the basis of caliper measurements, which might likely influence material strain, stiffness and failure load. Further studies should be performed by taking more subjects with different age groups and genders.

Conclusions

Our experiments showed that higher forces were transmitted in the origin and insertion areas than in areas of flat soft tissue reconstruction using attachment tubes. The data indicate that the tested material allows reattaching muscles, but without reinforcing the insertion site. Therefore, attachment tubes with region-dependent and potentially anisotropic material behavior might be advantageous to optimize muscle-bone load transmission after surgery, which may allow lower complication rates and shorter physical recovery.

Availability of data and materials

The dataset supporting the conclusions of this article is available upon readers request – please contact corresponding author (nlshammer@googlemail.com).

Open access

This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Abbreviations

%: percent; °C: centigrade; F: force; Hz: hertz; IL: Illinois; kN: kilonewton; kPa: kilopascal; MA: Massachusetts; min: minute; mm: millimeter; N: newton; USA: United States of America.

Competing interests

The authors have no conflict of interest to declare. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

Authors' contributions

SS, NH and PT planned and supervised the experiments. SS, MS and RM carried out the experiments. TW and RG provided technical support. SS, MS, RM and CS evaluated and interpreted the data. SS, RM, CS, NH and TP critically revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors would like to thank Gustav F. Preller assisted in proofreading the manuscript as a native speaker. Robert McPhee helped illustrating figure one. We acknowledge support from the German Research Foundation (DFG) and Universität Leipzig within the program of Open Access Publishing.

Author details

¹Department of Orthopedic, Trauma and Plastic Surgery, University of Leipzig, Liebigstraße 20, D-04103 Leipzig, Germany. ²Institute of Anatomy, University of Leipzig, Liebigstraße 13, D-04103 Leipzig, Germany. ³Department of Orthopaedic Surgery, Physical Medicine and Rehabilitation, University Hospital of Munich (LMU), Campus Grosshadern, Marchioninistraße 15, D-81377 Munich, Germany. ⁴Fraunhofer-Institut für Werkzeugmaschinen und Umformtechnik IWU, Medizintechnik, Nöthnitzer Str. 44, D-01187 Dresden, Germany. ⁵Department of Anatomy, University of Otago, Lindo Ferguson Building, 270 Great King St., Dunedin 9016, New Zealand.

Received: 5 August 2015 Accepted: 25 March 2016

Published online: 06 April 2016

References

- Gosheger G, Gebert C, Ahrens H, Streitburger A, Winkelmann W, Harges J. Endoprosthetic reconstruction in 250 patients with sarcoma. *Clin Orthop Relat Res*. 2006;450:164–71.
- Rais P, Kinkel S, Sauter U, Bruckner T, Lehner B. Replacement of the proximal humerus with MUTARS tumor endoprotheses. *Eur J Surg Oncol*. 2010;36:371–7.
- Schoof B, Jakobs O, Gehrke T, Gebauer M. Proximal femoral reconstruction after aseptic loosening following proximal femoral replacement for Ewing sarcoma: a case report with one-year follow-up. *Hip Int*. 2014;24:103–7.
- Gosheger G, Hillmann A, Lindner N, Rodl R, Hoffmann C, Burger H, Winkelmann W. Soft tissue reconstruction of megaprotheses using a trevira tube. *Clin Orthop Relat Res*. 2001;264–71.
- Mavrogenis AF, Ruggieri P, Mercuri M, Papagelopoulos PJ. Megaprosthesis reconstruction for malignant bone tumors: complications and outcomes. *J Long Term Eff Med Implants*. 2008;18:239–51.
- Harges J, Ahrens H, Nottrott M, Diekmann R, Gosheger G, Henrichs M, Streitburger A. Attachment tube for soft tissue reconstruction after implantation of a mega-endoprosthesis. *Oper Orthop Traumatol*. 2012;24:227–34.
- Wirganowicz PZ, Eckardt JJ, Dorey FJ, Eilber FR, Kato JM. Etiology and results of tumor endoprosthesis revision surgery in 64 patients. *Clin Orthop Relat Res*. 1999;64–74.
- Roberts P, Chan D, Grimer RJ, Sneath RS, Scales JT. Prosthetic replacement of the distal femur for primary bone tumours. *J Bone Joint Surg (Br)*. 1991; 73:762–9.
- Harges J, Gebert C, Schwappach A, Ahrens H, Streitburger A, Winkelmann W, Gosheger G. Characteristics and outcome of infections associated with tumor endoprotheses. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2006;126:289–96.
- Jeys L, Grimer R. The long-term risks of infection and amputation with limb salvage surgery using endoprotheses. *Recent Results Cancer Res*. 2009;179:75–84.
- Heisel C, Breusch SJ, Schmid G, Bernd L. Lower limb salvage surgery with MUTARS endoprotheses: 2 to 7 year results. *Acta Orthop Belg*. 2004;70:142–7.
- Guo W, Yang Y, Tang X, Ji T. Endoprosthetic reconstruction after resection of the tumor of the proximal femur. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi*. 2007;45:657–60.
- Winkelmann W. Reconstruction of the proximal femur with the MUTARS(R) system. *Orthopade*. 2010;39:942–8.
- Kuthe CD, Uddanwadiker RV, Ramteke A. Experimental evaluation of fiber orientation based material properties of skeletal muscle in tension. *Mol Cell Biomech*. 2014;11:113–28.
- Takaza M, Moerman KM, Gindre J, Lyons G, Simms CK. The anisotropic mechanical behaviour of passive skeletal muscle tissue subjected to large tensile strain. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2013;17:209–20.
- van Ee CA, Chasse AL, Myers BS. Quantifying skeletal muscle properties in cadaveric test specimens: effects of mechanical loading, postmortem time, and freezer storage. *J Biomech Eng*. 2000;122:9–14.
- Hammer N, Lingslebe U, Aust G, Milani TL, Hadrich C, Steinke H. Ultimate stress and age-dependent deformation characteristics of the iliotibial tract. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2012;16:81–6.
- Hammer N, Huster D, Fritsch S, Hadrich C, Koch H, Schmidt P, et al. Do cells contribute to tendon and ligament biomechanics? *PLoS One*. 2014;9: e105037.
- Gottsauner-Wolf F, Grabowski JJ, Chao EY, An KN. Effects of freeze/thaw conditioning on the tensile properties and failure mode of bone-muscle-bone units: a biomechanical and histological study in dogs. *J Orthop Res*. 1995;13:90–5.
- Komatsu F, Mori R, Uchio Y. Optimum surgical suture material and methods to obtain high tensile strength at knots: problems of conventional knots and the reinforcement effect of adhesive agent. *J Orthop Sci*. 2006;11:70–4.
- Steinke H, Lingslebe U, Bohme J, Slowik V, Shim V, Hadrich C, Hammer N. Deformation behavior of the iliotibial tract under different states of fixation. *Med Eng Phys*. 2012;34:1221–7.
- Jagodzinski M, Ettinger M, Haasper C, Hankemeier S, Breitmeyer D, Hurschler C, Krettek C. Biomechanische analyse der press-fit-Fixierung von Kreuzbandtransplantaten. *Unfallchirurg*. 2010;113:532–9.
- Evans WJ, Lexell J. Human aging, muscle mass, and fiber type composition. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 1995;50:11–6.
- Muramatsu T, Muraoka T, Takeshita D, Kawakami Y, Hirano Y, Fukunaga T. Mechanical properties of tendon and aponeurosis of human gastrocnemius muscle in vivo. *J Appl Physiol*. 2001;90:1671–8.
- Holzappel BM, Rech H, Lehner S, Pilge H, Gollwitzer H, Steinhäuser E. Alloplastic reconstruction of the extensor mechanism after resection of tibial sarcoma. *Sarcoma*. 2011;2011:545104.
- Pietschmann MF, Fröhlich V, Ficklscherer A, Hausdorf J, Utzschneider S, Jansson V, Müller PE. Pullout strength of suture anchors in comparison with transosseous sutures for rotator cuff repair. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2008;16:504–10.
- Pietschmann MF, Sadoghi P, Hauser E, Scharpf A, Gülecşyüz MF, Schröder C, et al. Influence of testing conditions on primary stability of arthroscopic knot tying for rotator cuff repair: slippery when wet? *Arthroscopy*. 2011;27: 1628–36.
- Pauwels F. *Gesammelte Abhandlungen zur Biomechanik des Bewegungsapparates*. Berlin: Springer; 1965.
- Fukunaga T, Ichinose Y, Ito M, Kawakami Y, Fukashiro S. Determination of fascicle length and pennation in a contracting human muscle in vivo. *J Appl Physiol*. 1997;82:354–8.
- Herbert RD, Moseley A, Butler JE, Gandevia SC. Change in length of relaxed muscle fascicles and tendons with knee and ankle movement in humans. *J Physiol*. 2002;539:637–45.
- Kot BC, Zhang ZJ, Lee AW, Leung VY, Fu SN. Elastic modulus of muscle and tendon with shear wave ultrasound elastography: variations with different technical settings. *PLoS One*. 2012;7:e44348.
- Muramatsu T, Muraoka T, Kawakami Y, Shibayama A, Fukunaga T. In vivo determination of fascicle curvature in contracting human skeletal muscles. *J Appl Physiol* (1985). 2002;92:129–34.
- Benninghoff A. *Lehrbuch der Anatomie des Menschen: Teil: Bd. 1., Allgemeine Anatomie und Bewegungsapparat*. 2nd ed. München, Berlin, Wien: Urban & Schwarzenberg; 1942.
- Eby SF, Cloud BA, Brandenburg JE, Giambini H, Song P, Chen S, et al. Shear wave elastography of passive skeletal muscle stiffness: Influences of sex and age throughout adulthood. *Clin Biomech (Bristol, Avon)*. 2014;30:22–7.
- Jansen L, Gondos A, Eberle A, Emrich K, Holleczek B, Katalinic A, Brenner H. Cancer survival in Eastern and Western Germany after the fall of the iron curtain. *Eur J Epidemiol*. 2012;27:689–93.
- Leonhardt H, Tillmann B, Töndury G, Zilles K. *Rauber/kopsch, anatomie des menschen*, vol. 2. Paris: Thieme; 1987. p. 272–3.
- Müller PE, Gülecşyüz MF, Schröder C, Fröhlich V, Häuser E, Hüttel U, Pietschmann MF. Biomechanische aspekten der rotatorenmanschettentennat: einfluss von nahtmaterial, knotentechnik und nahttechnik auf die primärstabilität. *Sport-Orthop-Sport-Traumatol-Sports Orthop Traumatol*. 2013;29:45–8.

3.3 Acellularization-Induced Changes in Tensile Properties Are Organ Specific - An In-Vitro Mechanical and Structural Analysis of Porcine Soft Tissues

S. Schleifenbaum¹, T. Prietzel¹, G. Aust, A. Boldt, S. Fritsch, I. Keil, H. Koch, R. Möbius, H. A. Scheidt, M. F. X. Wagner, N. Hammer

¹ These authors have contributed equally to this work.

Plos One 3/ 2016

Diese Studie untersuchte die mechanischen Veränderungen durch den Prozess der Dezellularisierung. Dazu wurde porcines Gewebe aus Ureter, Ösophagus (Hohlorganen) sowie Dermis mechanisch mit Hilfe uniaxialer Zugprüfungen untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass eine Veränderung der mechanischen Eigenschaften abhängig von der Art des Gewebes auftritt. Bei den Hohlorganen konnte eine Erhöhung des Elastizitätsmoduls und der maximalen Zugspannung durch die Dezellularisierung nachgewiesen werden. Die mechanischen Eigenschaften der Dermis wurden durch den Vorgang der Dezellularisierung negativ verändert.

Die Daten liefern Erkenntnisse für die mechanische Veränderung der Gewebe durch den Prozess der Dezellularisierung und dienen als Grundlage für den Einsatz von Ersatzmaterialien im Bereich der Weichteilrekonstruktion.

RESEARCH ARTICLE

Acellularization-Induced Changes in Tensile Properties Are Organ Specific - An *In-Vitro* Mechanical and Structural Analysis of Porcine Soft Tissues

Stefan Schleifenbaum¹✉, Torsten Prietzel¹✉, Gabriela Aust², Andreas Boldt³, Sebastian Fritsch⁴, Isabel Keil^{4,5}, Holger Koch⁶, Robert Möbius⁵, Holger A. Scheidt⁷, Martin F. X. Wagner⁴, Niels Hammer^{8*}

1 Department of Orthopedic, Trauma and Plastic Surgery, University of Leipzig, Germany, **2** Department of Surgery, Research Laboratories, University of Leipzig, Germany, **3** Institute of Clinical Immunology, University of Leipzig, Germany, **4** Institute of Materials Science and Engineering, Technische Universität Chemnitz, Chemnitz, Germany, **5** Institute of Anatomy, University of Leipzig, Leipzig, Germany, **6** Translational Centre for Regenerative Medicine (TRM), Leipzig, Germany, **7** Institute for Medical Physics and Biophysics, University of Leipzig, Leipzig, Germany, **8** Department of Anatomy, University of Otago, Dunedin, New Zealand

✉ These authors contributed equally to this work.

* nlshammer@googlemail.com



OPEN ACCESS

Citation: Schleifenbaum S, Prietzel T, Aust G, Boldt A, Fritsch S, Keil I, et al. (2016) Acellularization-Induced Changes in Tensile Properties Are Organ Specific - An *In-Vitro* Mechanical and Structural Analysis of Porcine Soft Tissues. PLoS ONE 11(3): e0151223. doi:10.1371/journal.pone.0151223

Editor: Adam J. Engler, University of California, San Diego, UNITED STATES

Received: September 21, 2015

Accepted: February 23, 2016

Published: March 9, 2016

Copyright: © 2016 Schleifenbaum et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper.

Funding: The authors have no support or funding to report.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Introduction

Though xenogeneic acellular scaffolds are frequently used for surgical reconstruction, knowledge of their mechanical properties is lacking. This study compared the mechanical, histological and ultrastructural properties of various native and acellular specimens.

Materials and Methods

Porcine esophagi, ureters and skin were tested mechanically in a native or acellular condition, focusing on the elastic modulus, ultimate tensile stress and maximum strain. The testing protocol for soft tissues was standardized, including the adaption of the tissue's water content and partial plastination to minimize material slippage as well as templates for normed sample dimensions and precise cross-section measurements. The native and acellular tissues were compared at the microscopic and ultrastructural level with a focus on type I collagens.

Results

Increased elastic modulus and ultimate tensile stress values were quantified in acellular esophagi and ureters compared to the native condition. In contrast, these values were strongly decreased in the skin after acellularization. Acellularization-related decreases in maximum strain were found in all tissues. Type I collagens were well-preserved in these samples; however, clotting and a loss of cross-linking type I collagens was observed

ultrastructurally. Elastins and fibronectins were preserved in the esophagi and ureters. A loss of the epidermal layer and decreased fibronectin content was present in the skin.

Discussion

Acellularization induces changes in the tensile properties of soft tissues. Some of these changes appear to be organ specific. Loss of cross-linking type I collagen may indicate increased mechanical strength due to decreasing transverse forces acting upon the scaffolds, whereas fibronectin loss may be related to decreased load-bearing capacity. Potentially, the alterations in tissue mechanics are linked to organ function and to the interplay of cells and the extracellular matrix, which is different in hollow organs when compared to skin.

Introduction

Surgical reconstruction following soft tissue injuries includes a variety of techniques which also use materials of biological origin [1,2]. Some issues are related to the application of biological tissues, including their availability—especially if these tissues originate from human donors. Another important aspect is the antigenicity induced by the donor tissue. One approach to solve this issue is to use hetero- or xenogeneic tissues further processed to acellular scaffolds [3–8]. Acellular scaffolds have reduced antigenicity [9] and provide a matrix exclusively consisting of extracellular matrix (ECM), which likely facilitates the processes of healing and biointegration [10].

Acellular scaffolds are frequently used in cardiac and vascular surgery [11–13], and in soft tissue repair of muscles, tendons and ligaments [14–17]. Also, scaffolds are used for plastic surgery following nerve injury [18] and tumors of the genitourinary tract [19–21]. In other studies, the biointegration processes of acellular implants were determined [7,21,22]. However, though the scaffolds are frequently applied, there is a lack of data characterizing them mechanically and comparing the acellular to the native condition, which may to some extent reflect tissue mechanics after integration into the host. Given this lack of mechanical data examined porcine esophagus, ureter and skin samples mechanically in both the native and the acellular condition, complementing histological and *in-vivo* studies of Koch et al. [21,22].

In previous studies we established and optimized a protocol to standardize the mechanical testing procedure of soft tissues, including partial plastination of the samples' ends [23–26] and adjustment of the samples' water content [25]. In the given study, we further optimized the protocol concerning sample dimensions. This approach aimed at easing the identification of the failure location. We applied this protocol to obtain mechanical properties of esophagus, ureter and skin samples and to compare these data at the microscopic and ultrastructural level. The following hypotheses were addressed:

1. Tensile properties of native or acellular porcine samples are different in esophagi, ureters and skin.
2. Acellularization causes changes in the tensile properties of esophagi, ureters and skin, as compared to the native condition.
3. Changes in the tensile behavior of acellular scaffolds are accompanied by morphological alterations in the scaffolds.

Materials and Methods

The tissues were obtained from four to seven month-old pigs post mortem following experiments approved by the Landesdirektion Sachsen animal welfare committee (TVV 38/12). Each specimen was prepared in a native and anatomically unfixed condition under constant moistening, precooled at 3°C and subsequently shock frozen at -85°C. The specimens were obtained within 24 hours or less to minimize potential effects of autolysis. 19 esophagi, 19 ureters and six skin specimens were obtained. A graphical summary of the experimental protocol is depicted in Fig 1.

Mechanical testing group: The esophagus and ureter specimens were further subdivided lengthwise cranial-caudally into two samples, resulting in 19 matched pairs of 2 samples each. The skin specimens were divided in 30 samples. One of each pair of samples were subjected to the acellularization procedure. The native counterparts remained frozen.

Osmotic stress group: Additionally, 258 small-scale samples were obtained from the contra-lateral side of each of the same individuals for determining the water content and establishing an osmotic stress protocol.

Acellularization procedure

The acellularization procedure was carried out according to [21,22]. To remove the cellular components the specimens were submerged in sodium dodecyl sulphate (SDS) for seven days in case of the esophagi and ureters and for 28 days in case of the skin specimens. Following this, the samples were rinsed 7 days in distilled water and shock frozen.

Osmotic stress protocol for adjusting the water content of the samples

The osmotic stress technique was applied as shown previously. [25]. Small parts of the native specimens of each tissue were used to determine the water content in the native condition. Seven native and seven acellular samples each were submerged in a tris-phosphate-buffered polyethyleneglycol (PEG) solution at concentrations of 2.0, 2.5 and 3.0 wt-% for 1, 2, 4, 8, 11 and 24 hours. Each specimen dialysed (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Germany; molecular weight cut off = 6–8 kDa). Afterwards, their water content was determined using lyophilization.

Sample plastination and mechanical testing

Both ends of the samples of the mechanical testing group were partially plastinated [23,25,26]. The central native or acellular parts of the samples were mounted between two templates to standardize their initial measurement sample length to 50 mm. Following this, the samples' water content was osmotically adapted for 24 hours to the respective native value of each tissue. For this purpose, 2.5-wt% PEG solutions were used for the esophagi and ureters and three-wt% PEG solutions for the skin.

For standardized tensile testing, the samples' width was sectioned using a template adapted from the German standard DIN 50125 [27]. The geometry of the template was adapted to the width of the three tissues as shown in Fig 2. The samples were clamped in a uniaxial testing machine (Typ 5566A, Instron, Norwood, MA, USA) and ten preconditioning cycles were applied to each sample with the following parameters: crosshead velocity $v = 20$ mm/min, minimum and maximum strain 0% to 5% of the initial length. In a next step, the cross-sectional areas were casted (VPS Hydro 380, Henry Schein Medical GmbH, Hamburg, Germany and REF 2112, Voco GmbH, Cuxhaven, Germany). Following this, a speckle pattern was sprayed onto each sample for digital image correlation. Then the tensile tests were performed with

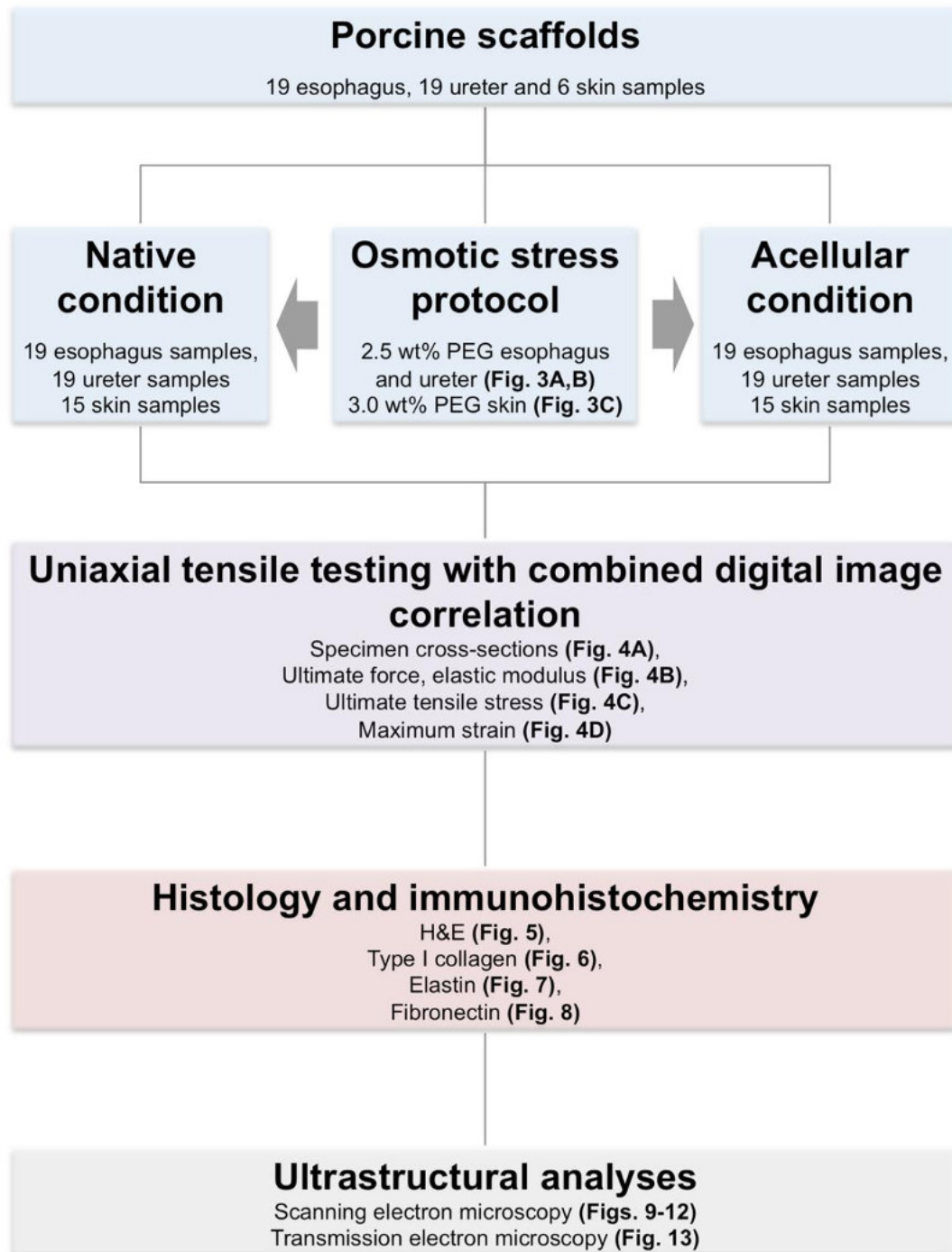
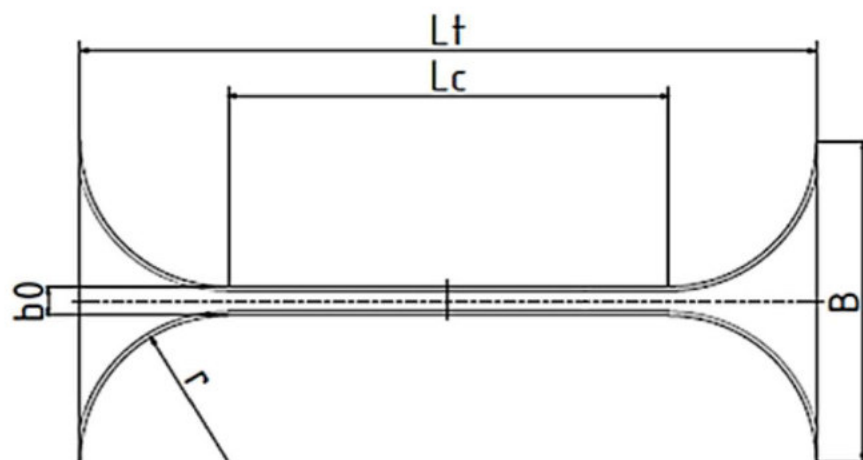


Fig 1. Flow chart summarizing the experimental protocol.

doi:10.1371/journal.pone.0151223.g001



Tissue	L_t	L_c	b_0	r	B
Esophagus	50	30	5	10	25
Ureter	50	30	2	10	22
Dermis	50	30	5	10	25

Fig 2. Template adapted from the DIN 50125 with standardized dimensions for the esophagus, ureter and skin samples.

doi:10.1371/journal.pone.0151223.g002

$v = 20$ mm/min and a strain corresponding to material failure, as indicated by a force-level decrease of at least 30% of the respective maximum value. The local stress-strain data were recorded using a digital image correlation system (Limes Meßtechnik und Software GmbH, Krefeld, Germany). The sample data were only evaluated from the respective experiment if they met all of the following inclusion criteria:

1. Material failure inside the region of parallel measuring length.
2. No macroscopically visible material slippage.
3. Sufficient data from digital image correlation for the determination of stress-strain-curves.

Histology and immunohistochemistry

The samples from the mechanical testing group with the template were fixed in paraformaldehyde, paraffin-embedded and sectioned at $5\ \mu\text{m}$ (Fig 1). Hematoxylin-eosin (HE) staining was carried out as reported previously [25]. For immunohistochemical staining, deparaffinized tissue sections were incubated with 1:100-diluted collagen I, elastin (both Acris Antibodies, Herford, Germany) or fibronectin (Dianova, Berlin, Germany) antibodies. Primary antibody binding was detected with the Envision DAB kit (DAKO Deutschland GmbH, Hamburg, Germany).

Ultrastructural analyses

Tissue samples of 5 to $10\ \text{mm}^3$ were prepared from native and acellular esophagus and ureters (both from the muscularis propria) and from the skin samples (subepidermal region), as indicated in Fig 1. The samples were immediately fixed in 3% glutaraldehyde/0.1 M phosphate

buffer (pH = 7.4) and then washed in distilled water. The samples used for scanning electron microscopy (SEM) were dehydrated, followed by the critical point drying process (CPD-030, Bal-Tec AG, Liechtenstein). SEM was carried out using a JSM-6700F field emission microscope (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) at magnifications between 1000x and 50,000x.

The samples for transmission electron microscopy (TEM) were washed in 0.1 M cacodylate buffer, post-fixed in 1% osmium tetroxide for 1 hour, again washed in distilled water, and dehydrated and infiltrated in ascending ethanol series, propylene oxide and resin. Semi-thin sections (1 μ m) were used for orientation before ultrathin sections were cut and collected on copper slot grids. The samples were contrasted with uranyl acetate and lead citrate. A Philips CM100 BioTWIN (Philips/FEI Corporation, Eindhoven, The Netherlands) equipped with a MegaView III digital camera (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Germany) was used to obtain TEM images at magnifications between 9700x and 66,000x.

Data processing and statistical analysis

The casts of the cross-sections were scanned with a resolution of 1200 dpi (Perfection 7V750Pro, Seiko Epson Corporation, Suwa, Japan) and calculated using Measure 2.1d (DatInf GmbH, Tübingen, Germany). To determine the local stress and strain data during mechanical testing, the ISTR 4D software (VRS 4.4.1.354, Dantec Dynamics, Ulm, Germany) was used. Elastic modulus, ultimate tensile stress and maximum strain (strain at ultimate tensile stress) was calculated using MATLAB 2011 (Mathworks, Natick, MA, USA). SPSS 20.0 software (IBM, IL, USA) and Excel 2013 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) were used to evaluate the data. Following the Kolmogorov-Smirnov test to determine normal distribution, comparison of the native to the acellular condition of the specimens was performed with the Wilcoxon-Signed-Ranks test or the paired Student's T-test. For a comparison between the different tissues, the ANOVA test with post-hoc analyses was applied. *P* values of 5% or less were considered as statistically significant. All values were presented in mean values \pm standard deviations.

Results

Native water content was different for esophagus, ureter and skin

The initial water content of the tissues was: $80.8 \pm 0.9\%$ for the esophagus, $56.4 \pm 7.3\%$ for the ureter and $67.5 \pm 3.1\%$ for the skin. In order to adjust the water content of the native and the acellular samples to an average value in the native condition, 2.5-wt% PEG solutions were used for the ureters and esophagi, whereas 3.0-wt% were used for the skin. The osmotic protocols are given in Fig 3.

Evaluation of esophagus, ureter and skin tensile data

Stress-strain data of 10/19 native and 8/19 acellular esophagi, 12/19 native and 14/19 acellular ureters were considered valid. The excluded samples failed to meet a speckle pattern sufficient for strain analysis throughout testing. 7/15 native and 10/15 acellular skin samples were considered valid. In the excluded skin samples, material slippage occurred and/or an insufficient speckle pattern hampered data acquisition.

Cross sections decreased to a different extent after acellularization

The cross sections of the native esophagi were significantly higher than those of the acellular esophagi with mean values of $8.2 \pm 2.0 \text{ mm}^2$ and $3.7 \pm 1.1 \text{ mm}^2$ ($p = 0.002$; Fig 4; Table 1), respectively. The ureters showed the same trend on a non-significant level ($p = 0.111$) with

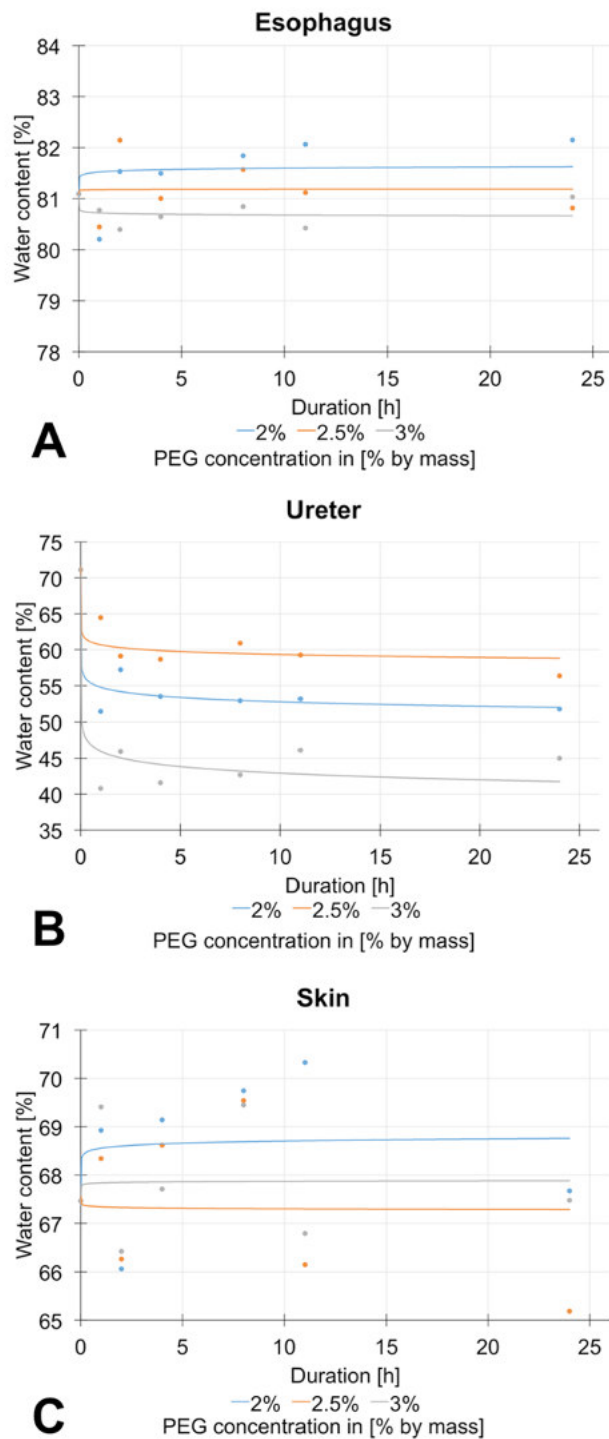


Fig 3. Osmotic stress protocol with different polyethyleneglycol (PEG) concentrations for 3A) esophagus 3B) ureter 3C) skin samples.

doi:10.1371/journal.pone.0151223.g003

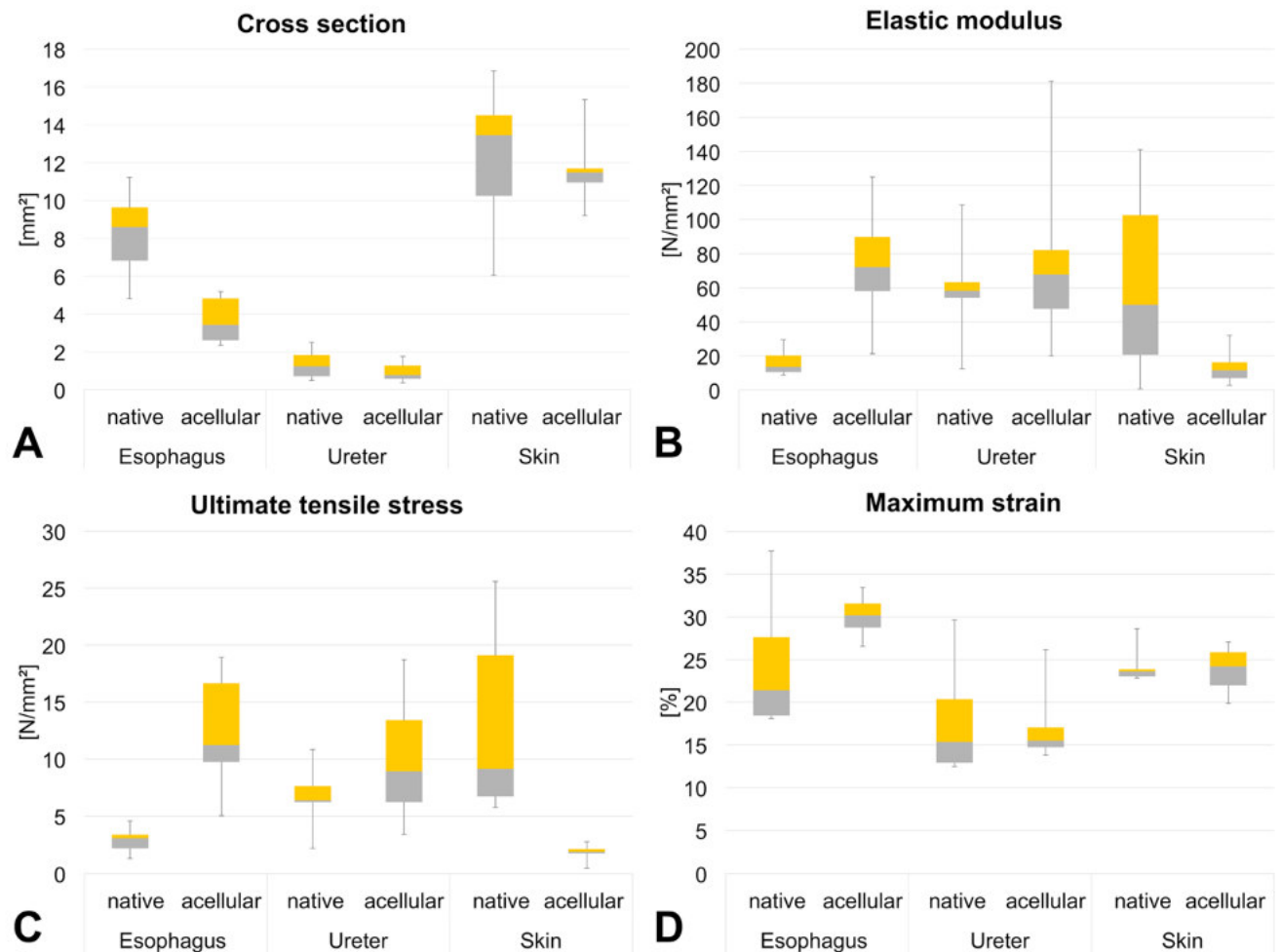


Fig 4. Boxplot from esophagus, ureter and skin samples in the native and acellular condition 4A) cross section 4B) elastic modulus 4C) ultimate tensile stress 4D) maximum strain.

doi:10.1371/journal.pone.0151223.g004

$1.3 \pm 0.7 \text{ mm}^2$ in the native condition and $0.9 \pm 0.4 \text{ mm}^2$ in the acellular condition. The behavior of the skin was similar with $12.4 \pm 3.3 \text{ mm}^2$ in the native condition and $11.7 \pm 1.6 \text{ mm}^2$ in the acellular condition.

Ultimate force increased in acellular esophagus samples but decreased in skin samples

Ultimate force values were $23.9 \pm 2.0 \text{ N}$ for the native esophagi and $45.5 \pm 5.0 \text{ N}$ for the acellular esophagi. The ureters showed no change with $9.3 \pm 1.4 \text{ N}$ in the native and $8.7 \pm 1.9 \text{ N}$ in the acellular condition. In contrast, the skin samples were more resilient in the native than in the acellular condition with ultimate forces of $163.3 \pm 24.2 \text{ N}$ and $21.6 \pm 0.9 \text{ N}$, respectively.

Table 1. Mean and standard deviation with the *p* value for the comparison native versus acellular condition.

	Cross section [mm ²]		Elastic modulus [N/mm ²]		Maximum strain [%]		Ultimate tensile stress [N/mm ²]	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD
Esophagus								
native	8.23	0.66	16.1	7.08	24.65	7.93	2.9	0.99
acellular	3.67	0.44	73.22	30.89	30.09	2.49	12.38	4.51
<i>p value</i>	0.002		0.002		0.104		<0.001	
Ureter								
native	1.34	0.66	61.46	24.2	17.24	5.29	6.91	2.15
acellular	0.91	0.44	73.21	40.46	16.98	3.87	9.52	4.29
<i>p value</i>	0.111		0.517		0.882		0.255	
Skin								
native	12.41	3.29	62.56	52.26	24.24	1.99	13.16	7.36
acellular	11.73	1.57	12.83	7.87	23.83	2.53	1.84	0.55
<i>p value</i>	0.484		0.052		0.841		0.009	

doi:10.1371/journal.pone.0151223.t001

Increased elastic moduli were observed in acellular esophagi and ureters but decreasing values were found in acellular skin samples

The esophagus specimens were significantly less stiff in the native condition compared to the acellular, with mean elastic moduli of 16.1 ± 7.1 MPa and 73.2 ± 30.9 MPa, respectively ($p = 0.002$; Fig 4; Table 1). The elastic moduli of the ureter samples were similar in the native than in the acellular condition with 61.5 ± 24.2 MPa and 73.2 ± 40.5 MPa, respectively. The elastic modulus tended to be higher in the native than in the acellular skin samples with 62.6 ± 52.3 MPa and 12.8 ± 7.9 MPa, respectively ($p = 0.052$). Comparison of the elastic moduli between the native esophagi and ureters yielded significantly lower values in the esophagus compared to the ureter and skin samples ($p \leq 0.02$; Table 2). In the acellular samples, the skin was significantly less stiff than the ureters and the skin ($p \leq 0.002$).

Ultimate tensile stress values increased in acellular esophagi and ureters but strongly decreased in skin samples

In the esophagi, ultimate tensile stress increased significantly with 2.9 ± 1.0 MPa and 12.4 ± 4.5 MPa in the native compared to the acellular condition ($p < 0.001$, Fig 4; Table 1). In the ureters 6.9 ± 2.2 MPa and 9.5 ± 4.3 MPa were determined for the native and acellular samples,

Table 2. *P* value for the comparison between the different tissues.

<i>P</i> value	Ureter vs. esophagus	Ureter vs. skin	Esophagus vs. skin
Elastic modulus			
native	0.008	1	0.02
acellular	1	<0.001	0.002
Maximum strain			
native	<0.001	0.022	0.157
acellular	<0.001	0.007	0.042
Ultimate tensile stress			
native	0.960	0.011	<0.001
acellular	0.316	<0.001	<0.001

doi:10.1371/journal.pone.0151223.t002

respectively. An extended decrease in ultimate tensile stress was observed in the skin samples with native values of 13.2 ± 7.4 MPa and acellular values of 1.8 ± 0.6 MPa ($p = 0.009$). Native skin yielded higher ultimate tensile stress values compared to the esophagi and ureters ($p \leq 0.011$), whereas acellular skin yielded lower ultimate tensile stress values ($p < 0.001$) when compared to the esophagus and ureters (Table 2).

Maximum strain differed between the tissues but not between the native and acellular condition

Slight and non-significant decreases of maximum strain were observed in esophagus and skin samples. In contrast, maximum strain values increased in the acellular ureters (Fig 4; Table 1). Comparison of the tissues in the native condition yielded lower values of the ureters compared to the esophagus and skin samples ($p \leq 0.022$; Table 2). In the acellular condition, higher maximum strain values were found in the esophagus compared to the skin samples and in the skin compared to the ureter samples ($p \leq 0.042$).

Histology and immunohistochemistry indicated cell removal and intact ECM

In the HE-stained sections of all samples the tissue layers remained anatomically intact before and after acellularization. Distinct mucosal, submucosal and muscular layers were observed in the native esophagus (Fig 5A) and ureter samples (Fig 5C). The acellular esophagus (Fig 5B) and ureter samples (Fig 5D) showed wide gaps between the collagen matrix, especially in the tunica muscularis. The native skin samples showed a distinct stratum corneum, granulosum, mucosum and germinativum (Fig 5E). Cells were observed at varying numbers in the respective layers. The acellular skin samples showed no stratum corneum and no signs of cellular structures in the respective layers (Fig 5F). Thinning was observed in all samples following acellularization, being most pronounced in the esophagi.

Type I collagen was found throughout the native and acellular esophagus, ureter and skin samples (Fig 6). Overall, collagen was more condensed in the acellular compared to the native samples, especially in the tunica muscularis of the esophagi (Fig 6B) and ureters (Fig 6D) as well as the subepidermal regions of the cutis (Fig 6F). In the esophagi and ureters, elastic fibers were observed especially in the submucosal region, the tunica muscularis and to some extent also in the adventitia and in blood vessels (Fig 7A–7D). The skin samples showed low quantities of elastic fibers, mostly in the vessels and dermal perivascular regions (Fig 7E and 7F). Similarly, fibronectin was present throughout the native and acellular esophagi and ureters (Fig 8A–8D), mainly located in the mucosal and muscular layers. The skin revealed lower contents of fibronectin, mostly situated in the epidermis and to a lesser extent in the dermis (Fig 8E). Acellularization of the skin was accompanied by a marked fibronectin washout in the dermis (Fig 8F).

Electron microscopy revealed clotted type I collagens and loss of cross-linking fibers but intact collagen fibril structure

In SEM, type I collagen fibers were found in high density (Fig 9). In the native esophagi, no major direction of fiber alignment could be observed (Fig 9A). Acellularization caused clotting of the collagen network (Fig 9B), which becomes more evident on the fibrillar level, accompanied by the loss of cross-linking fibers (Fig 10A and 10B). Similar observations were seen in tunica muscularis of the ureters (Figs 9C, 9D, 10C and 10D) and the skin (Fig 9E and 9F). Here, clotting appeared to be more pronounced (Fig 10E and 10F). Fiber and fibril directions

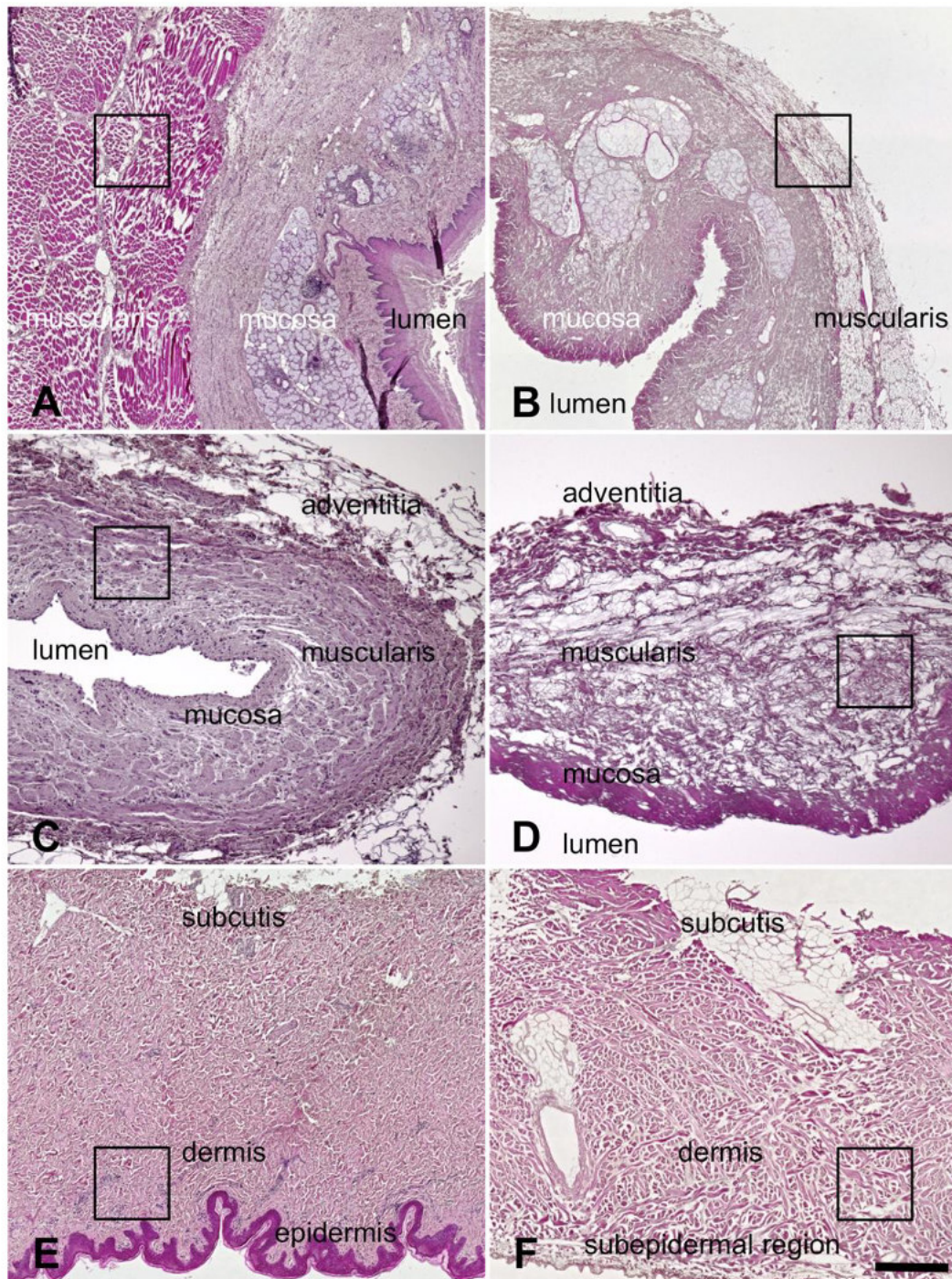


Fig 5. Hematoxylin-eosin stained-samples of 5A) native esophagus 5B) acellular esophagus 5C) native ureter 5D) acellular ureter 5E) native skin 5F) acellular skin. In spite of the removal of the cellular structures the respective tissue layers remained intact structurally. A marked thinning was observed in the tunica media of the esophagi and some thinning in the ureters. In the acellular skin samples the epidermis was completely removed. Black rectangles indicate the regions where samples for electron microscopy were obtained (also refer to Figs 9 to 13). Scale bar: 300 μ m (5A,B), 100 μ m (5C,D), 300 μ m (5E, F).

doi:10.1371/journal.pone.0151223.g005

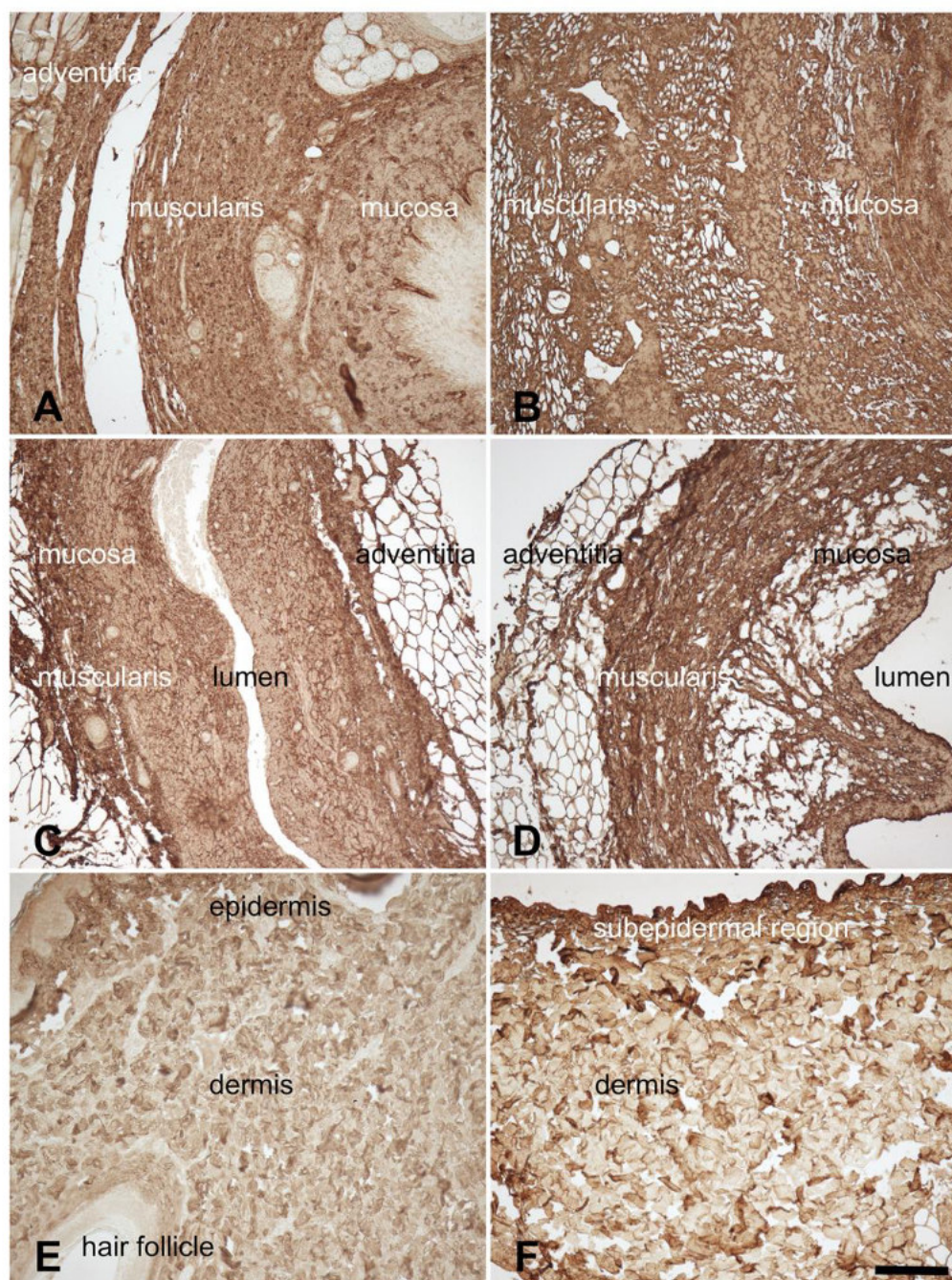


Fig 6. Anti-type I collagen staining of 6A) native esophagus 6B) acellular esophagus 6C) native ureter 6D) acellular ureter 6E) native skin 6F) acellular skin. Collagens were observed throughout the native and acellular scaffolds but appeared to be more condensed in the latter, especially in the tunica muscularis (6B,D) and in the subepidermal regions (6F). Scale bar 100 μ m.

doi:10.1371/journal.pone.0151223.g006

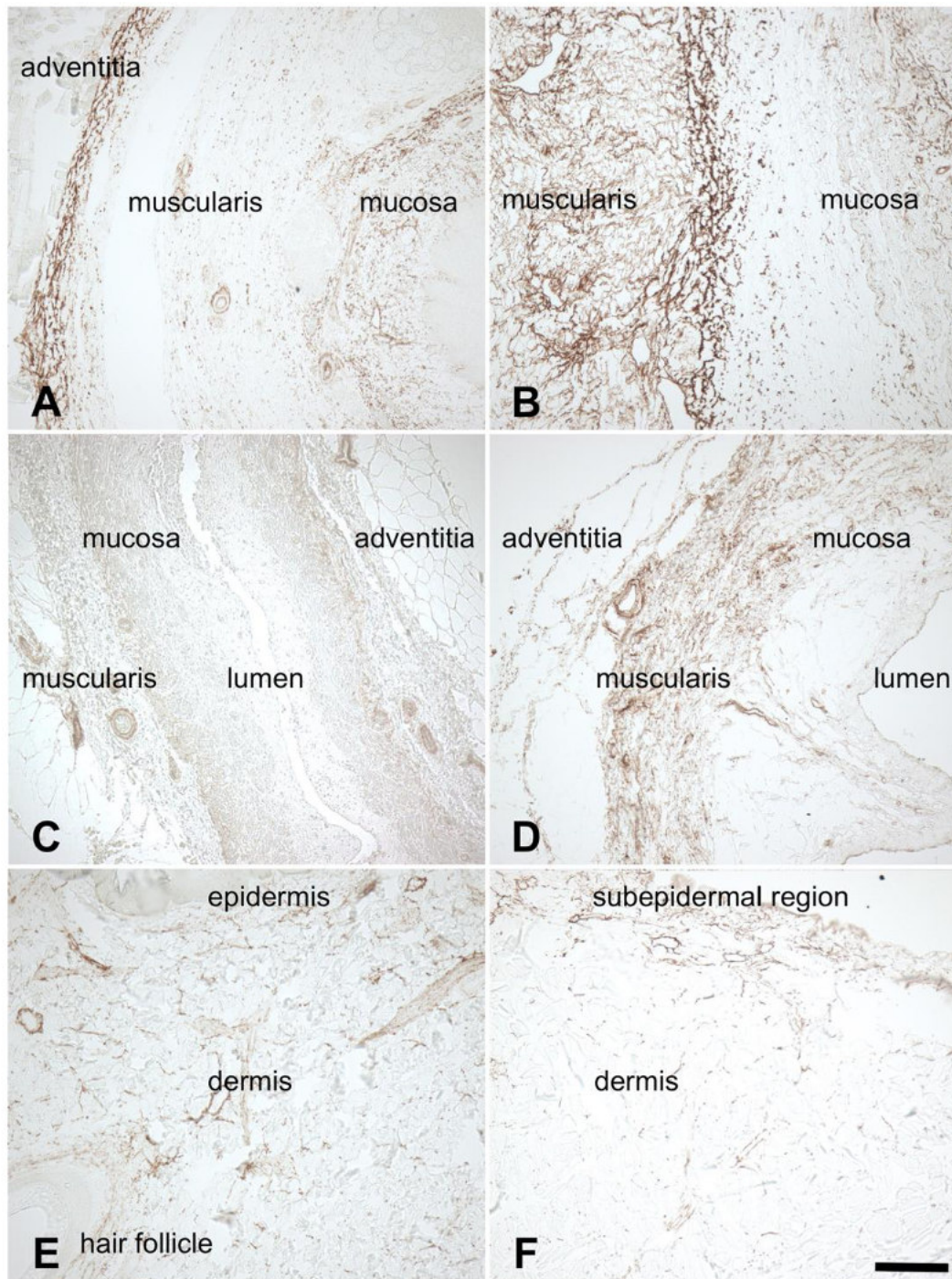


Fig 7. Anti-elastin staining of 7A) native esophagus 7B) acellular esophagus 7C) native ureter 7D) acellular ureter 7E) native skin 7F) acellular skin. Elastic fibers were observed in the submucosal regions, the tunica muscularis, to some extent in the adventitia and in blood vessels (7A-D). The skin samples showed low quantities of elastic fibers, mostly in the vessels and dermal perivascular regions (Fig 7E,F). Scale bar 100 μ m.

doi:10.1371/journal.pone.0151223.g007

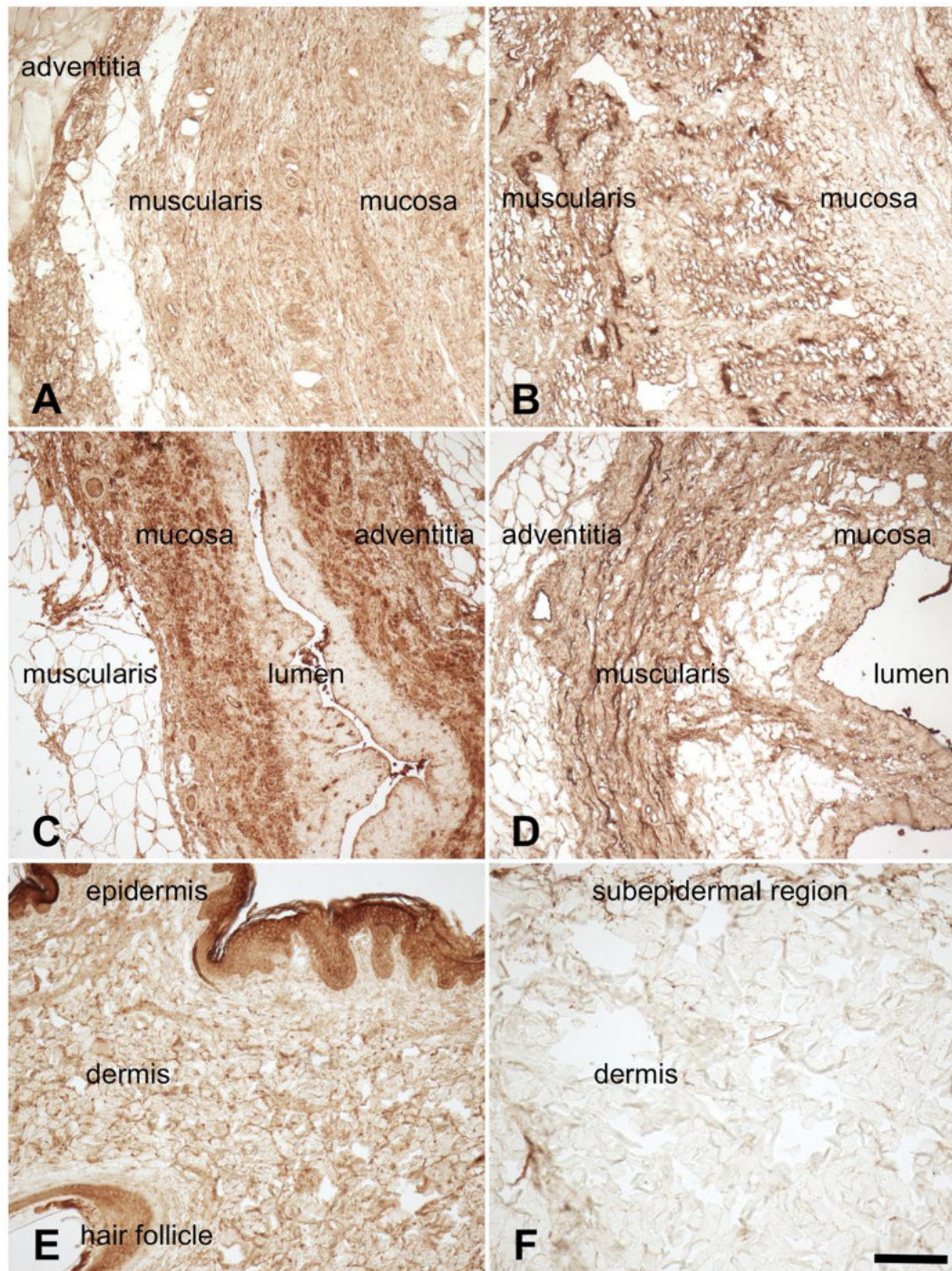


Fig 8. Anti-fibronectin staining of 8A) native esophagus 8B) acellular esophagus 8C) native ureter 8D) acellular ureter 8E) native skin 8F) acellular skin. Fibronectins were found throughout the ureters in the native (8A,C) and the acellular condition (8B,D), especially in the muscosal and muscular layers. A marked fibronectin washout was observed in the acellular (8F) compared to the native skin (8E) samples, especially in the dermal regions. Scale bar 100 μ m.

doi:10.1371/journal.pone.0151223.g008

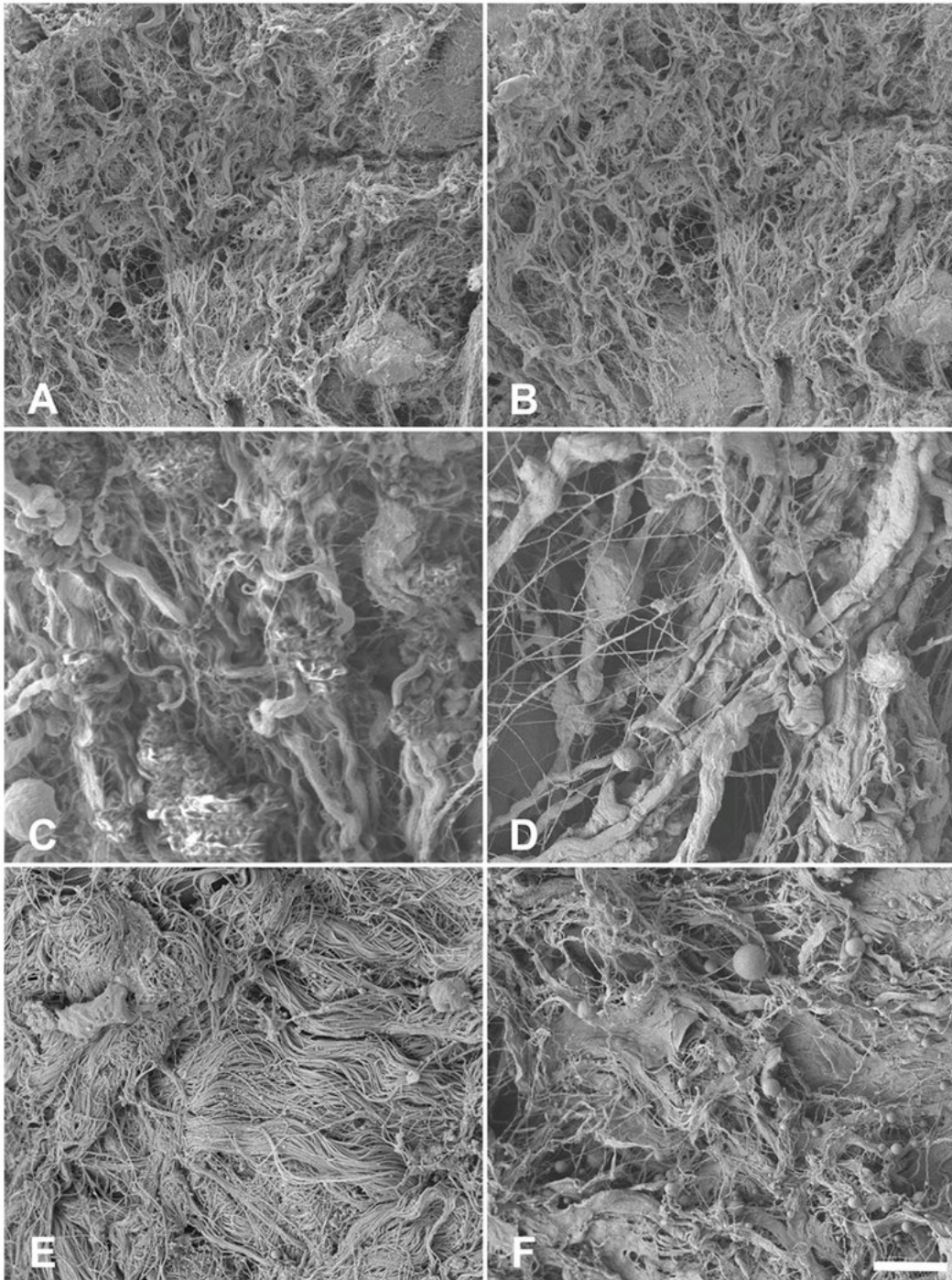


Fig 9. Scanning electron microscopy of 9A) native esophagus 9B) acellular esophagus 9C) native ureter 9D) acellular ureter 9E) native skin 9F) acellular skin. Type I collagens appeared remain largely intact in the 1000x magnification without noticeable major direction in the tunica muscularis of the esophagi and the ureters but in the dermal skin layer. Scale bar 10 μ m.

doi:10.1371/journal.pone.0151223.g009

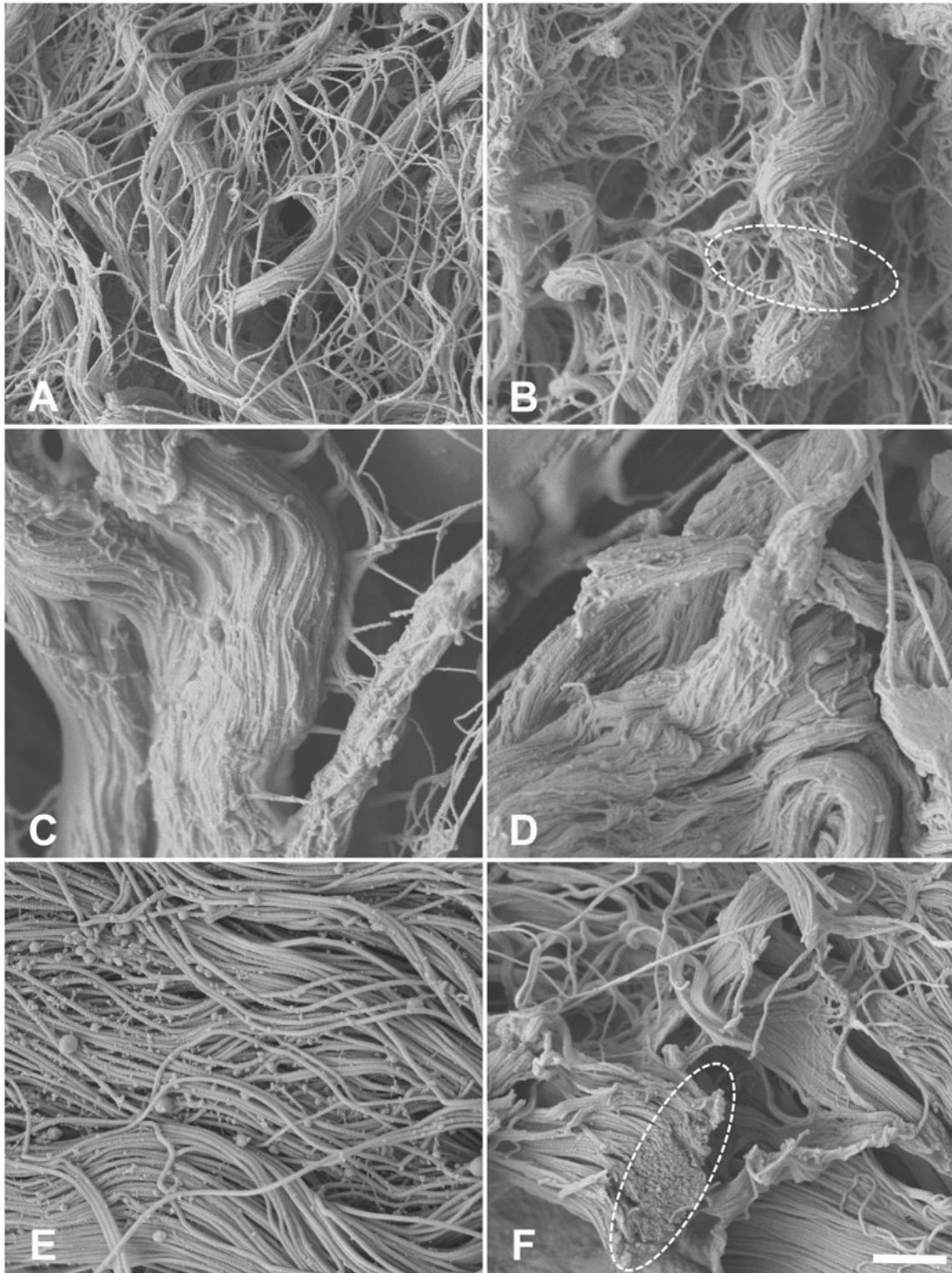


Fig 10. Scanning electron microscopy of 10A) native esophagus 10B) acellular esophagus 10C) native ureter 10D) acellular ureter 10E) native skin 10F) acellular skin. In the higher 10,000x magnification type I collagen clotting was observed (interrupted circles) accompanied by a loss of cross-linking collagens. Scale bar 1 μ m.

doi:10.1371/journal.pone.0151223.g010

were clearly distinguishable especially in the dermal regions (Figs 10E, 10F and 11). Emptied hair follicles and adjacent root sheaths were seen in the subepidermal layers of the skin (Fig 12). Here, the surrounding tissues appeared to be loosened.

TEM confirmed that the collagen fibrils remained intact in both native and acellular samples (Fig 13). Fibril diameters were smaller in the esophagi and ureters compared to the skin. The characteristic 67-nm band was observed in both native and acellular samples (Fig 13), indicating structurally intact fibrils. No marked collagen fibril breakage was observed (Fig 11).

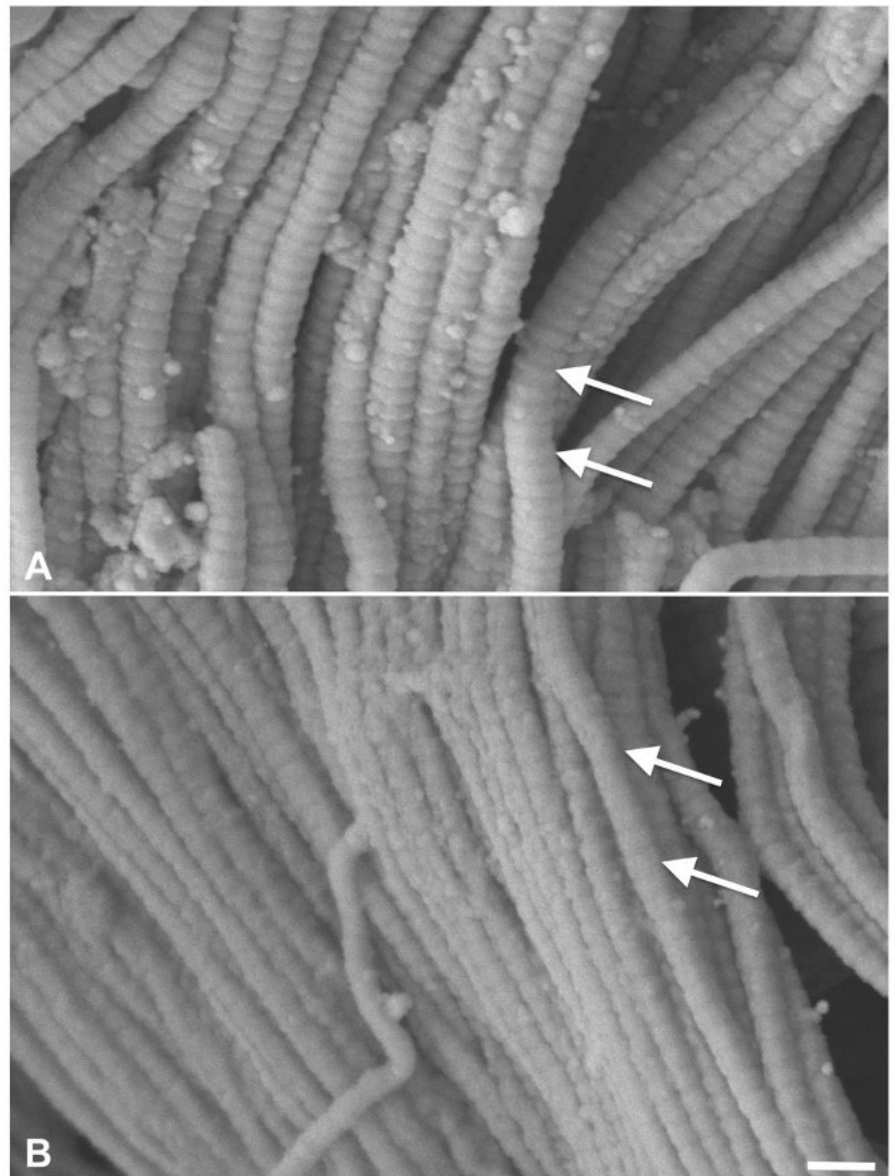


Fig 11. Scanning electron microscopy of the dermal areas of 11A) native skin 11B) acellular skin. Intact fibrils were observed at the 50,000x-magnification with the collagen-characteristic D-period at a 67-nm distance (white arrows), resembling the findings from transmission electron microscopy. Scale bar 150 nm.

doi:10.1371/journal.pone.0151223.g011

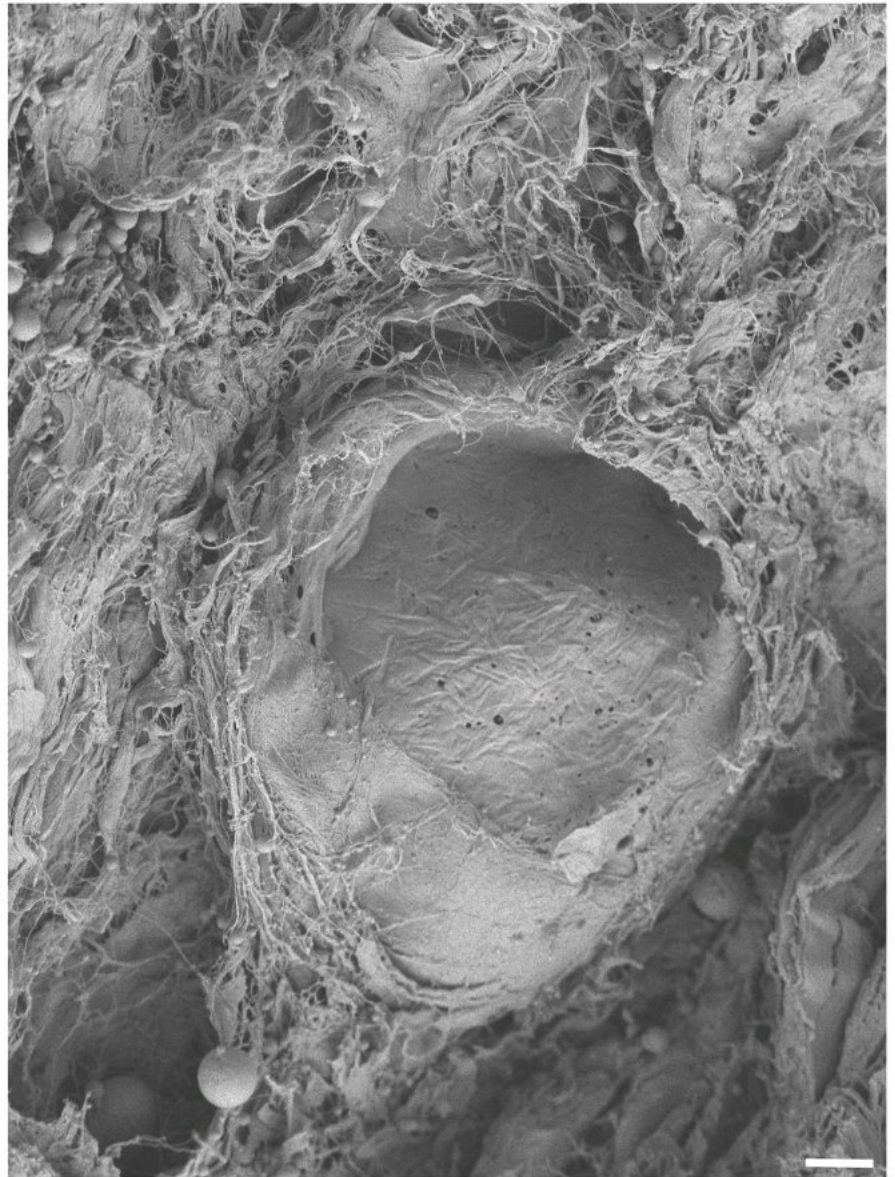


Fig 12. An emptied hair follicle root sheath is depicted in the subepidermal region of porcine skin. The surrounding tissue appears to be loosened and may be indicative of notching effects in skin samples. Scale bar 5 μm (1000x magnification).

doi:10.1371/journal.pone.0151223.g012

Discussion

Optimized test protocols facilitated direct comparison of the tensile properties of various soft tissues in native and the acellular conditions

One major aim of this study was to further optimize a setup for uniaxial tensile testing of soft tissues [23,25,26]. For this purpose, an osmotic stress protocol was established for each of the tissue types to adjust their water content close to the native situation. Furthermore, the

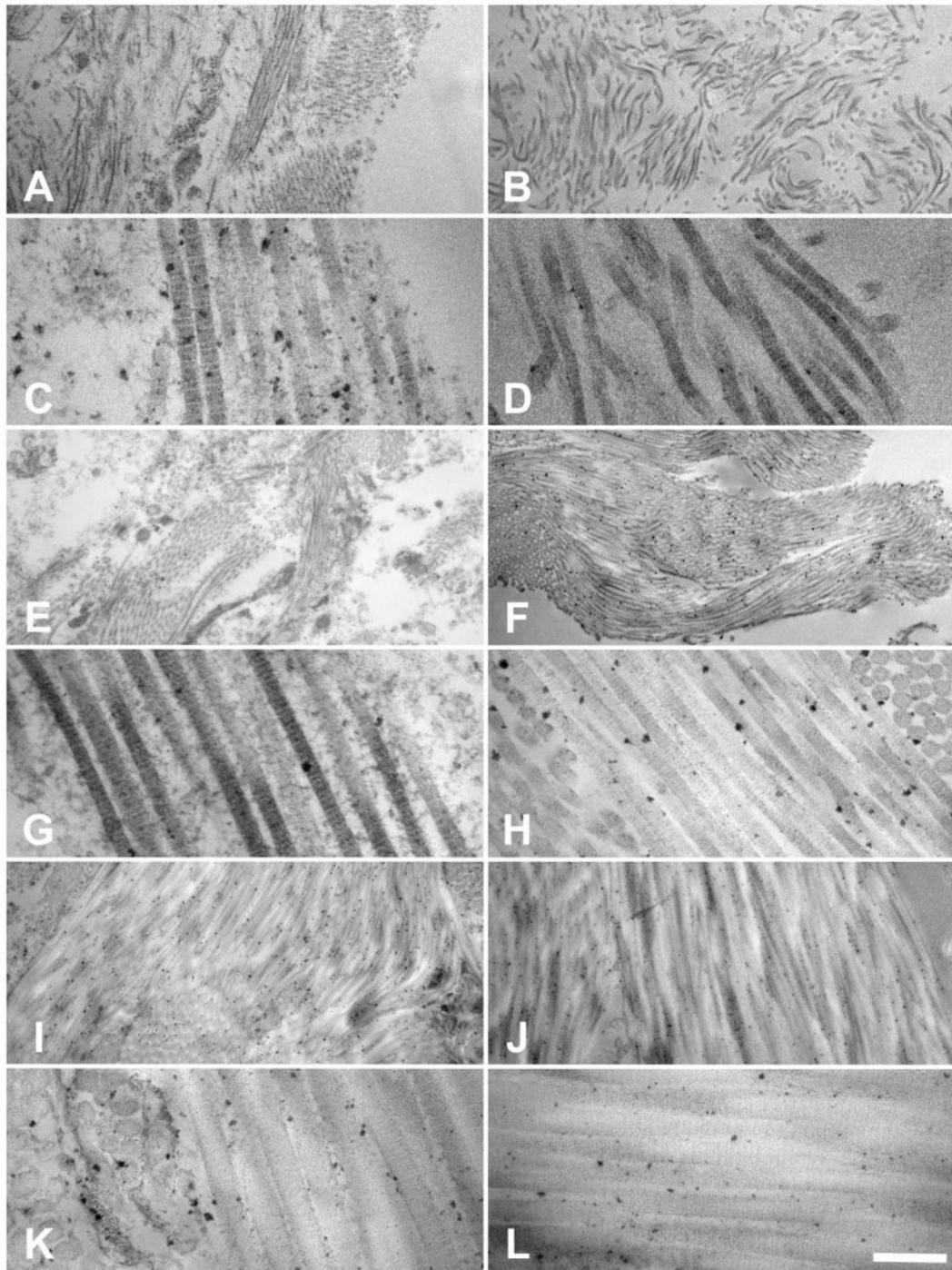


Fig 13. Transmission electron microscopy of 13A-D esophagi (tunica muscularis), 13E-H ureters (tunica muscularis), 13I-L skin (dermis) with focus on type I collagens. Left column (13A,C,E,G,I,K): native condition, right column (13B,D,F,H,J,L): acellular condition. Intact collagen fibers and fibrils were observed throughout the native and acellular scaffolds with the collagen-characteristic D-period at a 67-nm distance. Scale bar 1250 nm (13A,B,E,F,I,J; magnification 9700x) and 200 nm (13C,D,G,H,K,L; magnification 66,000x).

doi:10.1371/journal.pone.0151223.g013

samples' ends were plastinated partially to minimize material slippage occurring during the tensile experiments [26] before the samples' water content was adjusted for each group based on the osmotic stress protocol. Additionally, the sample dimensions were standardized in length and width during and after the plastination, using a template adapted from the German standard DIN 50125 [27]. Uniaxial tensile data were obtained from all samples using the same test parameters.

Additionally, samples' cross sections were casted after preconditioning and before the tensile testing to further minimize the error introduced by different sample thickness. Finally, the native and acellular samples were compared successfully. Though a few samples were excluded from further evaluation because of the strict to inclusion criteria, this approach allowed for meaningful and comparable results.

Reduced cross-sections indicated different cell quantities in the soft tissues

Acellularization-related reductions in the samples' cross-sections varied depending on the origin of the tissues. In the esophagus samples, the significant reduction of 55% of the cross-section indicated that a vast majority of the tissue consists mainly of cells and only to a minority of ECM. This finding was confirmed by histology, where the different smooth muscle layers could hardly be differentiated in the acellular condition. In ureter samples the reduction of the cross section reached 32%, which was in line with the smaller dimensions of the samples and smooth muscle layers compared to the esophagus. In the skin, the reduction only reached 5%, demonstrating the it is a ECM-rich tissue.

Acellularization increased elastic moduli and ultimate tensile stress in hollow organs, but decreased these values in skin

Acellularization induced increased elastic modulus and ultimate tensile stress values of hollow organs such as the esophagus and ureter. This may partially be attributed to the reductions in the samples cross sections in the acellular esophagi and ureters but also to the removal of muscle cells, which potentially have lower elastic moduli and ultimate tensile stress values in a non-contracted state compared to the ECM. However, the observed increase in the ultimate force values of the esophagus samples indicates that additional phenomena will likely be responsible for the increased load-bearing capacity following acellularization. These findings may likely be related to the ECM, although the total collagen, elastin and fibronectin contents appeared to be constant, as indicated by immunohistochemistry in previous experiments [21,22]. Collagen fibril structure remained intact. These findings are in line with our previous data on the nano-structural properties of human iliotibial tract collagens, using ^{13}C CP MAS NMR [28].

From a functional point of view, the ECM serves as a backbone for the muscle cells forming the outer shape of the organs. The peristaltic function of these organs is guaranteed by contractile elements such as actin-myosin chains and which are a part of the intracellular matrix. Given the extensive networking between the muscle cells and the ECM, transverse forces occurring in the tensile experiments may weaken the composite structure in the native condition. Since the cells were largely removed, transverse forces may have largely been minimized to the effect of higher elastic moduli and ultimate tensile stress values in the acellular samples of esophagus and ureter. We observed ultrastructural evidence for altered collagen geometry in acellular esophagi and ureters. Collagen was clotted, accompanied by the loss of cross-linking fibers, potentially with a similar effect on decreasing transverse forces and increasing load-bearing capacity. This proposed reduction of transverse forces related to loss of cells and

collagen crosslinking might be more pronounced in the acellular esophagi compared to the acellular ureters due to the relatively large tunica muscularis.

In contrast, the acellular skin samples yielded largely decreased elastic moduli and ultimate tensile stress values, accompanied by vast decreases in ultimate force. The tensile data are in line with previously published data on acellular skin [29]. Given the mechanical function of the skin to resist forces from various directions, the ECM might be regarded as a main mechanical actor of this organ. The dense network of elastins and collagens is interrupted by hair follicles and excretory ducts of sebaceous and sweat glands. Here, the primary function of cells may be production of ECM rather than primarily acting as a mechanical stabilizer. We suggest three reasons for the decreased load-bearing capacity of skin following acellularization. First, due to the acellularization procedure, the stratum corneum was completely removed, decreasing mechanical strength. Second, the removal of the hair follicles may have caused the potential weakening of the skin. In the native condition, the follicles filled spaces as incompressible elements. In the acellular condition, the SDS washed out the follicles, which left behind cavities, which may cause notch effects in the uniaxial tensile experiments, further weakening the skin. We found ultrastructural evidence supporting this theory with loosened collagen networks surrounding the emptied follicles, but intact collagen fibrils. Third, the loss of proteoglycans with adjacent fibronectin may have caused inferior tensile properties. Fibronectin is a binding protein of the formed ECM fraction. Proteoglycans are well-known to be altered by SDS [4,30]. In our given setup, skin acellularization needed 28 days, but only 7 days for the esophagus and ureter specimens. This comparably long time frame may have facilitated the proteoglycan washout, lowering mechanical strength.

Acellularization-related changes in maximum strain were minute for esophagi, ureters and skin. This finding indicates that the passive properties of the respective cells hardly influence the tensile properties of the tissues in terms of mechanical strain. Thus, the tensile mechanical properties were altered tissue-dependently, to a varying extent and differently for the different tissues, indicating that the influence of the cellular components and/or the chemicals used for acellularization is different. Hypothesis 1, claiming that tensile properties of native or acellular porcine samples are different in esophagi, ureters and skin, can therefore be accepted.

Clinical implications

Acellular scaffolds are frequently used for the surgical reconstruction of tendon, ligament or other soft tissue injuries [1,4,15,31–35]. Vascular and cardiac surgery is another field of application [4,36–38]. Another potential application would be the surgical reconstruction of the esophagus following burns. Additionally, esophageal tumors or tumors of genitourinary tract are potential sites of application. The main advantage of acellular scaffolds is their reduced antigenicity due to the partial or complete absence of cellular proteins [30]. Short repopulation rates were shown elsewhere for the esophagus [22] and ureters [21]. However, the acellularization might be accompanied by altered mechanical properties and a potential weakening of the scaffolds, which are intended to be implanted [4,39]. The same is true for repopulated scaffolds, in which degradation processes were found following implantation [15,39]. Our direct comparison of native versus acellular tissue also indicated that alterations in the mechanical properties may not only be caused by degradation of ECM in the scaffolds, but also by the load-altering properties of cells.

An in-depth knowledge on scaffold behavior is of interest not only for orthotopic but also for heterotopic implantations. Inter comparison of the esophagus, ureter and skin samples showed that each of the tissues had different mechanical properties in both the native and acellular condition. Especially the decrease in the elastic modulus and ultimate tensile stress of skin

samples is an indicator of the difference in behavior of the esophagi and ureters. Hypothesis 2, claiming that acellularization causes changes in the tensile properties of esophagi, ureters and skin, as compared to the native condition, can therefore also be accepted. Consequently, from a biomechanical point of view, acellular esophagus and ureter samples may be recommended as scaffolds for the orthotopic surgical reconstruction or replacement. This is not the case for acellular skin scaffolds treated with SDS, if the dermal scaffolds are likely to be subjected to significant mechanical loads.

The third hypothesis, stating that changes in the tensile properties of acellular scaffolds are accompanied by morphological alteration in the scaffolds, can likewise be accepted. Beyond extensive cell removal, we observed collagen clotting and loss of cross-linking collagen fibers in acellular esophagus and ureter samples causing increased mechanical tensile strength. *Vice versa*, we found a fibronectin removal in acellular skin samples having decreased mechanical strength.

Limitations

First, only a limited number of suitable samples was available for the study, which was partially related to our strict inclusion criteria. Second, using SDS resulted in a different duration of acellularization to the effect that degradation may have influenced the values to a different extent. Third, the effects of cross linking scaffolds by various chemicals have not been investigated in this study. Further experiments would help substantiate the effects of different acellularization protocols on the effectiveness and the mechanical properties not only *in vitro* as in our study, but also *in vivo* in long-term experiments.

Acknowledgments

The authors would like to thank Gustav F. Preller, who assisted in proofreading the manuscript as a native speaker. Judith Craatz and Bettina Glatte helped with the histology and immunohistochemistry samples. Elizabeth Girvan, Sharon Lequeux and Allan Mitchell assisted with the scanning and transmission electron microscopy. The authors also appreciate Christine Auste for her help with the images and graphics. We acknowledge support from the German Research Foundation (DFG) and Universität Leipzig within the program of Open Access Publishing.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SS TP RM MW NH. Performed the experiments: SS GA AB SF IK HK HS. Analyzed the data: SS IK. Contributed reagents/materials/analysis tools: SS GA AB SF IK HK HS. Wrote the paper: SS TP GA AB SF IK HK RM HS MW NH. Planned and supervised the experiments: SS TP RM MW NH. Carried out the experiments and provided technical support: SS GA AB SF IK HK HS. Evaluated and interpreted the data: SS IK. Critically revised the manuscript: SS TP GA AB SF IK HK RM HS MW NH.

References

1. Chen J, Xu J, Wang A, Zheng M (2009) Scaffolds for tendon and ligament repair: review of the efficacy of commercial products. *Expert Rev Med Devices* 6 (1): 61–73. doi: [10.1586/17434440.6.1.61](https://doi.org/10.1586/17434440.6.1.61) PMID: [19105781](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19105781/)
2. Pridgen BC, Woon CYL, Kim M, Thorfinn J, Lindsey D, Pham H et al. (2011) Flexor tendon tissue engineering: acellularization of human flexor tendons with preservation of biomechanical properties and biocompatibility. *Tissue Engineering Part C: Methods* 17 (8): 819–828.
3. Rubin L, Schweitzer S (2005) The use of acellular biologic tissue patches in foot and ankle surgery. *Clin Podiatr Med Surg* 22 (4): 533–52, vi. PMID: [16213378](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16213378/)

4. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF (2006) Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials* 27 (19): 3675–3683. PMID: [16519932](#)
5. Badylak SF, Freytes DO, Gilbert TW (2009) Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. *Acta Biomaterialia* 5 (1): 1–13. doi: [10.1016/j.actbio.2008.09.013](#) PMID: [18938117](#)
6. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF (2011) An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials* 32 (12): 3233–3243. doi: [10.1016/j.biomaterials.2011.01.057](#) PMID: [21296410](#)
7. Song JJ, Ott HC (2011) Organ engineering based on decellularized matrix scaffolds. *Trends in Molecular Medicine* 17 (8): 424–432. doi: [10.1016/j.molmed.2011.03.005](#) PMID: [21514224](#)
8. Sundermann SH, Muggler O, Caliskan E, Reser D, Manka R, Holubec T et al. (2015) Extracellular matrix for reconstruction of cardiac structures after tumour resections. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 20 (1): 10–14. doi: [10.1093/icvts/ivu310](#) PMID: [25232129](#)
9. Rovak JM, Bishop DK, Boxer LK, Wood SC, Mungara AK, Cederna PS (2005) Peripheral nerve transplantation: the role of chemical acellularization in eliminating allograft antigenicity. *Journal of reconstructive microsurgery* 21 (3): 207–213. PMID: [15880301](#)
10. Wainwright D, Madden M, Luterman A, Hunt J, Monafu W, Heimbach D et al. (1996) Clinical evaluation of an acellular allograft dermal matrix in full-thickness burns. *Journal of Burn Care & Research* 17 (2): 124–136.
11. Schmidt CE, Baier JM (2000) Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering. *Biomaterials* 21 (22): 2215–2231. PMID: [11026628](#)
12. Cebotari S, Mertsching H, Kallenbach K, Kostin S, Repin O, Batrinac A et al. (2002) Construction of autologous human heart valves based on an acellular allograft matrix. *Circulation* 106 (12 suppl 1): I.
13. Jo W, Sohn Y, Choi YH, Kim HJ, Cho HD (2007) Modified acellularization for successful vascular xenotransplantation. *Journal of Korean medical science* 22 (2): 262–269. PMID: [17449935](#)
14. Sung H, Liang H (2003) Repair of ligaments, tendons, muscle and cartilage using a graft formed of connective tissue crosslinked with genipin: Google Patents.
15. Adams JE, Zobitz ME, Reach JS, An K, Steinmann SP (2006) Rotator cuff repair using an acellular dermal matrix graft: an in vivo study in a canine model. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery* 22 (7): 700–709.
16. Branch JP (2011) A tendon graft weave using an acellular dermal matrix for repair of the Achilles tendon and other foot and ankle tendons. *J Foot Ankle Surg* 50 (2): 257–265. doi: [10.1053/j.jfas.2010.12.015](#) PMID: [21354014](#)
17. Ehsan A, Lee DG, Bakker AJ, Huang JI (2012) Scapholunate ligament reconstruction using an acellular dermal matrix: a mechanical study. *The Journal of hand surgery* 37 (8): 1538–1542. doi: [10.1016/j.jhsa.2012.04.043](#) PMID: [22749483](#)
18. Borschel GH, Kia KF, Kuzon WM Jr, Dennis RG (2003) Mechanical properties of acellular peripheral nerve. *Journal of Surgical Research* 114 (2): 133–139. PMID: [14559438](#)
19. Hopper RA, Woodhouse K, Semple JL (2003) Acellularization of Human Placenta With Preservation of the Basement Membrane: A Potential Matrix for Tissue Engineering. *Annals of Plastic Surgery* 51 (6).
20. Brown AL, Farhat W, Merguerian PA, Wilson GJ, Khoury AE, Woodhouse KA (2002) 22 week assessment of bladder acellular matrix as a bladder augmentation material in a porcine model. *Biomaterials* 23 (10): 2179–2190. PMID: [11962659](#)
21. Koch H, Hammer N, Ossmann S, Schierle K, Sack U, Hofmann J et al. (2015) Tissue engineering of ureteral grafts: preparation of biocompatible crosslinked ureteral scaffolds of porcine origin. *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 3.
22. Koch H, Graneist C, Emmrich F, Till H, Metzger R, Aupperle H et al. (2012) Xenogenic Esophagus Scaffolds Fixed with Several Agents: Comparative In Vivo Study of Rejection and Inflammation. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012: 11.
23. Hammer N, Lingslebe U, Aust G, Milani TL, Hädrich C, Steinke H (2012) Ultimate stress and age-dependent deformation characteristics of the iliotibial tract. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* 16: 81–86. doi: [10.1016/j.jmbbm.2012.04.025](#) PMID: [23178479](#)
24. Steinke H, Lingslebe U, Böhme J, Slowik V, Shim V, Hädrich C et al. (2012) Deformation behavior of the iliotibial tract under different states of fixation. *Medical engineering & physics* 34 (9): 1221–1227.
25. Hammer N, Huster D, Fritsch S, Hädrich C, Koch H, Schmidt P et al. (2014) Do cells contribute to tendon and ligament biomechanics. *PLoS ONE* 9 (8): e105037 EP -. doi: [10.1371/journal.pone.0105037](#) PMID: [25126746](#)
26. Sichtung F, Steinke H, Wagner MF, Fritsch S, Hädrich C et al. (2015) Quantification of material slippage in the iliotibial tract when applying the partial plastination clamping technique. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* 49: 112–117. doi: [10.1016/j.jmbbm.2015.04.028](#) PMID: [26005842](#)

27. Deutsches Institut für Normung e.V.: Prüfung metallischer Werkstoffe (2009) Prüfung metallischer Werkstoffe - Zugproben (DIN 50125 77.040.10). Berlin: Beuth Verlag GmbH.
28. Hammer N, Huster D, Boldt A, Hädrich C, Koch H, Hammer N (2016) A preliminary technical study on sodium dodecyl sulfate-induced changes of the nano-structural and macro-mechanical properties in human iliotibial tract specimens. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*.
29. Hoganson DM, O'Doherty EM, Owens GE, Harilal DO, Goldman SM, Bowley CM et al. (2010) The retention of extracellular matrix proteins and angiogenic and mitogenic cytokines in a decellularized porcine dermis. *Biomaterials* 31 (26): 6730–6737. doi: [10.1016/j.biomaterials.2010.05.019](https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.05.019) PMID: [20576289](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20576289/)
30. Schulze-Tanzil G, Al-Sadi O, Ertel W, Lohan A (2012) Decellularized Tendon Extracellular Matrix—A Valuable Approach for Tendon Reconstruction. *Cells* 1 (4): 1010–1028. doi: [10.3390/cells1041010](https://doi.org/10.3390/cells1041010) PMID: [24710540](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24710540/)
31. Lee DK (2008) A preliminary study on the effects of acellular tissue graft augmentation in acute Achilles tendon ruptures. *The Journal of Foot and Ankle Surgery* 47 (1): 8–12. PMID: [18156058](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18156058/)
32. Barber FA, Aziz-Jacobo J (2009) Biomechanical testing of commercially available soft-tissue augmentation materials. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery* 25 (11): 1233–1239.
33. Ellis CV, Kulber DA (2012) Acellular dermal matrices in hand reconstruction. *Plastic and reconstructive surgery* 130 (5S-2): 256S.
34. Rao BM, Kamal TT, Vafaye J, Taylor L (2012) Surgical repair of hip abductors. A new technique using Graft Jacket[®] allograft acellular human dermal matrix. *International orthopaedics* 36 (10): 2049–2053. doi: [10.1007/s00264-012-1630-6](https://doi.org/10.1007/s00264-012-1630-6) PMID: [22872412](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22872412/)
35. Lovati AB, Bottagisio M, Moretti M (2016) Decellularized and Engineered Tendons as Biological Substitutes: A Critical Review. *Stem Cells International* 2016.
36. Chung S, Hazen A, Levine JP, Baux G, Olivier WA, Yee HT et al. (2003) Vascularized acellular dermal matrix island flaps for the repair of abdominal muscle defects. *Plastic and reconstructive surgery* 111 (1): 225–232. PMID: [12496583](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12496583/)
37. Hülsmann J, Grün K, El Amouri S, Barth M, Hornung K, Holzfuß C et al. (2012) Transplantation material bovine pericardium: biomechanical and immunogenic characteristics after decellularization vs. glutaraldehyde-fixing. *Xenotransplantation* 19 (5): 286–297. doi: [10.1111/j.1399-3089.2012.00719.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3089.2012.00719.x) PMID: [22978462](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22978462/)
38. Byrom MJ, Ng MKC, Bannon PG (2013) Biomechanics and biocompatibility of the perfect conduit—can we build one. *Annals of Cardiothoracic Surgery* 2 (4): 435. doi: [10.3978/j.issn.2225-319X.2013.05.04](https://doi.org/10.3978/j.issn.2225-319X.2013.05.04) PMID: [23977620](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23977620/)
39. Tischer T, Aryee S, Wexel G, Steinhauser E, Adamczyk C, Eichhorn S et al. (2009) Tissue engineering of the anterior cruciate ligament—sodium dodecyl sulfate-acellularized and revitalized tendons are inferior to native tendons. *Tissue Engineering Part A* 16 (3): 1031–1040.

4 Diskussion

Die in dieser Arbeit vorgestellten Studien untersuchen die passiv-mechanischen Eigenschaften biologischer Gewebe vor dem Hintergrund der chirurgischen Defektrekonstruktion nach Hüftendoprothetik. Unter Zuhilfenahme des uniaxialen Zugversuchs wurden die Spannungs-Dehnungsdaten der einzelnen Hüftkapselbänder sowie von porcinem, dezellularisiertem Gewebe ermittelt. Ziel hierbei war es, das native System auf Basis mechanischer Kennwerte zu beschreiben und ein mögliches Ersatzmaterial für die Weichteilrekonstruktion zu bestimmen.

Des Weiteren wurden Ausrissversuche durchgeführt, welche zu einem besseren Verständnis des Versagensverhaltens der nativen Muskel-Knochen-Anbindung beitragen sollen. Diese Erkenntnisse wurden mit einer textilen Anbindungsvariante verglichen, die nach tumorendoprothetischer Weichteilrekonstruktion eingesetzt wird.

Etablierung eines standardisierten Prüfprotokolls

Für die Untersuchungen der Hüftkapselbänder sowie des dezellularisierten Gewebes wurde ein standardisiertes Prüfprotokoll verwendet (siehe Kapitel 2.4.1, 3.1 und 3.3). Dabei war es ein wichtiges Ziel, dass das Protokoll die Einflussfaktoren Wassergehalt, Geometrie und Einspannung der Proben berücksichtigt. Zusätzlich wurden weitere Aspekte wie Querschnittsbestimmung und optische Dehnungsmessung miteinbezogen. Das erstellte Prüfprotokoll wurde aufbauend auf bisher bekannten Problemstellungen aus der Literatur [67,69,73–85] weiterentwickelt und soll letztlich zu einer Standardisierung und Vergleichbarkeit derartiger Untersuchungsergebnisse führen.

Der Einfluss des Wassergehalts auf die mechanischen Eigenschaften von biologischem Gewebe konnte bereits von Betsch et al. [76] und Nicolle et al. [82] nachgewiesen werden. Eine Dehydrierung der Proben führt zu einer Abnahme der Bruchdehnung sowie Steigerung des Elastizitätsmoduls (E-Modul). Um den Einfluss des Wassergehaltes auf die mechanischen Eigenschaften zu verringern, nutzten Hammer et al. [69] den Ansatz den Wassergehalt bei mechanischen Testungen mittels osmotischer Stresstechnik zu kontrollieren. Die von Hammer vorgestellte Methode wurde auch im Rahmen dieser Arbeit angewandt (siehe Kapitel 2.4.1). Dadurch konnte gewährleistet werden, dass die Proben zu Versuchsbeginn den gleichen Wassergehalt aufwiesen.

Im Vergleich zur Testung von beispielsweise Metallen (DIN 50125) [72] gibt es keine einheitliche oder genormte Probenform bei Zugproben aus biologischem Gewebe. In der Literatur werden jedoch unterschiedliche Anpassungen der Probengeometrien aufgezeigt

[26,81,86,87]. Ein anderer Ansatz besteht darin, die Proben in ihrem anatomischen Ausgangszustand zu belassen [84,88]. Im Rahmen dieser Arbeit bestand das Ziel, eine allgemeingültige Probengeometrie zu entwickeln, die sich an der DIN 50125 [72] orientiert. Der Variabilität des Spendermaterials wurde in diesem Zusammenhang mit einer Variation von Probenlänge und -breite entgegengewirkt. (siehe Abbildung 8).

Die Einspannung bei biologischen Gewebeproben stellt ein wesentliches Problem in der Materialprüfung dar, da teilweise eine unzureichende Klemmkraft aufgebracht werden kann. Dies kann wiederum zum Schlupf der Proben während der mechanischen Belastung und somit aufgrund überschätzten Dehnverhaltens und daher zu einer Verfälschung der Messergebnisse führen. In der Literatur werden verschiedene Varianten der Einspannung, z. B. strukturierte Klemmen [85] oder Kryo-Klemmen [84], diskutiert. Während strukturierte Klemmen Beschädigungen des Gewebes im Einspannbereich hervorrufen können, besteht bei der Verwendung von Kryo-Klemmen die Gefahr, dass die Proben aufgrund des hohen Wasseranteils nicht nur im Bereich der Einspannung, sondern auch im Messbereich einfrieren. Auf den beschriebenen Nachteilen der verschiedenen Einspannungskonzepte basierend, entwickelten Steinke et al. [67] sowie Hammer et al. [68] die Methode der partiellen Plastination. Diese verfolgt das Ziel, den Materialschlupf zu reduzieren und den Einfluss der Einspannung auf die mechanischen Eigenschaften der Probe zu minimieren. Sichtung et al. [77] wiesen einen deutlich geringeren Materialschlupf bei plastinierten Proben im Vergleich zu nicht plastinierten Proben mittels digitalem Bildkorrelationssystem nach. Zusätzlich zeigten er und seine Forschergruppe, dass durch die Verwendung einer optischen Dehnungsmessung die Möglichkeit besteht, Messfehler, welche aus dem Schlupf der Proben resultieren, zu korrigieren. Ein weiterer Vorteil des digitalen Bildkorrelationssystems ist die berührungslose Messung des Verschiebungsfeldes direkt auf der Probenoberfläche. Dieses Verfahren findet in zahlreichen aktuellen Studien Anwendung [69,77,89–92].

Wie bereits in anderen Studien nachgewiesen wurde, zeigte sich auch in dieser Arbeit, dass die zyklische Vorkonditionierung eine Stabilisierung der mechanischen Eigenschaften hervorruft [73–75,78] (siehe Abbildung 10). In den meisten vorangegangenen relevanten Publikationen werden nicht alle im Prüfprotokoll beschriebenen Faktoren bei der mechanischen Testung berücksichtigt [26,68,76,81,83,86,92–96]. Die Intention dieser Arbeit bestand somit darin, mehrere Einflussfaktoren in einem Prüfprotokoll zur Anwendung zu bringen.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die beschriebene Methodik zielführend angewendet werden konnte. Auf diese Weise wird ein standardisiertes Vorgehen bei der mechanischen Prüfung biologischer Gewebe unterstützt. Folglich werden die Ergebnisse unterschiedlicher mechanischer Untersuchungen vergleichbar und lassen objektive Rückschlüsse auf Ersatzmaterialien und deren Eigenschaften zu. Zudem resultiert daraus die Vergleichbarkeit der vorliegenden Studien (siehe Kapitel 3.1 und 3.3) dieser Arbeit.

Vergleich der Kapselbänder mit dezellularisiertem Gewebe

Der Vergleich der mechanischen Kenndaten der Hüftkapselbänder und des dezellularisierten Gewebes zeigt, dass nur die Hohlorgane als Ersatzmaterial in Frage kommen, da die Kenndaten der dezellularisierten Dermis zu gering sind. Ein möglicher Grund liegt in der vollständigen Entfernung des Stratum corneum durch den Prozess der Dezellularisierung. Die maximale Zugfestigkeit des Ösophagus liegt bei ca. 3 N/mm^2 über der der Kapselbänder. Die ermittelte Zugfestigkeit des Ureters liegt hingegen im Bereich der Kapselbänder. Das E-Modul der Hohlorgane ist um den Faktor drei größer als das der Kapselbänder. Die Bruchdehnung des Ösophagus beträgt nur ein Drittel und die des Ureters gar nur ein Viertel des Wertes der Kapselbänder.

Aus den Daten lässt sich ableiten, dass sich die Hohlorgane zumindest theoretisch bezüglich der maximalen Zugfestigkeit sowie des E-Moduls als Ersatzmaterial eignen, sofern eine luftdichte Anbindung im Sinne des Kapselersatzes möglich ist. Die höheren Werte der Zugfestigkeit und des E-Moduls dezellularisierter Hohlorgane könnten somit einen Sicherheitsfaktor darstellen. Problematisch ist jedoch die verringerte Dehnung der Hohlorgane gegenüber den Kapselbändern. Es ist noch offen, ob und in welchem Maße sich die mechanischen Eigenschaften der Hohlorgane nach einer Besiedelung mit körpereigenen Zellen remodellieren lassen und inwieweit diese Effekte einen möglichen Kapselersatz darstellen. Die mechanischen Eigenschaften, welche im Rahmen dieser Arbeit ermittelt wurden, zeigen allerdings, dass die Hohlorgane vielversprechende Ersatzmaterialien sein könnten. Die vorliegenden Studien stellen allenfalls eine biomechanische Grundlage dar. Unter Berücksichtigung der Durchmesser der Hohlorgane [97,98] ist deren Anwendung als Kapselersatz kritisch, da der mittlere Durchmesser des Hüftkopfes deutlich größer ist [99].

Klinischer Ausblick

In der chirurgischen Versorgung werden durch den operativen Zugang oder die notwendige Entfernung erkrankter Strukturen häufig Weichteildefekte erzeugt. Hierzu gehören unter anderem die Entfernung der Hüftgelenkscapsel [100] oder der partielle Verlust der muskulären Knochenanbindung [101,102]. Diese Defekte können gegenwärtig intraoperativ nur unzureichend behoben werden. Auf die Lebensqualität operativ versorgter Patienten hat dies wiederum negative Auswirkungen, da sie ein erhöhtes Risiko für die Hüftgelenksluxation mit sich bringen. Insbesondere der Erhalt der Hüftgelenkscapsel wird nicht standardmäßig durchgeführt [100,103].

Für die großflächige Rekonstruktion der Muskelanbindung nach tumorendoprothetischer Versorgung ist aktuell nur der Trevira®-Anbindungsschlauch kommerziell verfügbar [21,104]. Diese Anbindungsvariante besteht aus einem textilen Polyethylenterephthalat-Gewirk, an welches die Muskulatur zur Wiederherstellung der Gelenkfunktion primär angenäht werden kann [21,57]. Außerdem ist sekundär ein Einwachsen des Gewebes in das Gewirk möglich, wodurch eine dauerhafte, innige Weichteilanbindung gewährleistet wird. Ein Nachteil des Trevira®-Anbindungsschlauchs ist jedoch, dass er sich für die Kapselrekonstruktion aufgrund der Gewirkstruktur nicht eignet. Grund hierfür ist, dass sich auf diese Weise die Kapsel des zu rekonstruierenden Gelenks nicht hermetisch und mechanisch belastbar verschließen lässt. Eine vielversprechende Alternative stellen dezellularisierte Gewebe dar. Allerdings ist auch hier noch zu untersuchen, ob derartige Funktionen realisierbar sind.

Dezellularisierte Gewebe könnten das Einwachsverhalten verbessern. Dies liegt in ihrer verminderten Antigenität [35], sowie der Möglichkeit des Umbaus der Matrix durch körpereigene Bindegewebszellen [32,33]. Hierdurch könnte der Heilungsprozess und die erneute Mobilisation des Gelenkes beschleunigt werden. Für die Weichteilrekonstruktion nach tumorendoprothetischer Versorgung wäre besonders der dezellularisierte Ösophagus geeignet. Die Matrix würde dem Gewebe eine Substanz zum Einwachsen bieten. Durch seine Schlauchform ist eine vergleichbare Handhabung analog zum Trevira®-Anbindungsschlauch vorstellbar, jedoch weist der Ösophagus keinen ausreichend großen Durchmesser auf. Aus diesem Grund muss eine alternative Matrix gefunden werden, die äquivalente Eigenschaften bezüglich des Nahtverhaltens aufweist.

Zusammenfassend bieten dezellularisierte Gewebe eine Möglichkeit für einen biologischen Hüftkapselersatz. Alternativ kann es als Muskelanbindung nach tumorendoprothetischer Versorgung fungieren. Somit birgt die Weichteilrekonstruktion unter Einsatz von dezellularisiertem Gewebe ein großes Potential bei der Versorgung von

Hochrisikopatienten und deren zügiger Mobilisation. In weiteren Studien bleibt zu untersuchen, welches Gewebe sich durch seine Abmaße zur Verwendung als alternative Extrazellulärmatrix anbietet. Weiterhin ist dabei zu erforschen, wie sich die Biointegrität sowie die Rezellularisierung längerfristig entwickeln.

Limitierungen

Für die dieser Promotionsarbeit zugrundeliegenden Studien stellt die begrenzte Probenanzahl der jeweiligen Untersuchungen eine Limitierung dar. Eine größere Probenmenge hätte zu einer sichereren statistischen Aussage geführt. Diese wurde jedoch in einigen Fällen zusätzlich durch ein komplettes Herausrutschen der Probe aus der Einspannung minimiert. Da die Auswertung mittels Bildkorrelation nicht möglich war, wurden die Ergebnisse des Versuches nicht berücksichtigt. Weiterhin könnte sich das Einfrieren der Proben, welches zur Lagerung notwendig ist, auf die mechanischen Eigenschaften ausgewirkt haben [105]. Aufgrund der einheitlichen Handhabung der Proben kann diese Auswirkung allerdings als systematisch angenommen werden.

5 Zusammenfassung der Arbeit

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. rer. med.

Experimentelle Untersuchung passiv-mechanischer Eigenschaften der Hüftkapsel und umliegender Gewebe zur Entwicklung biologischer Matrices für die Defektrekonstruktion des Hüftgelenks

eingereicht von

Stefan Schleifenbaum

angefertigt an der

Universität Leipzig, Klinik für Orthopädie, Unfallchirurgie und plastische Chirurgie

betreut von

Prof. Dr. med. Andreas Roth, PD Dr. med. Torsten Prietzel und Prof. Dr. med. habil. Niels Hammer

Januar 2018

Die endoprothetische Versorgung des Hüftgelenks stellt eines der am häufigsten durchgeführten und erfolgreichsten operativen Behandlungsverfahren dar. Mögliche Komplikationen sind vor allem die aseptische Lockerung und die Luxation. Strategien zur Verringerung der Luxationshäufigkeit bei Patienten sind unter anderem die Schonung sowie die Rekonstruktion des umliegenden Weichteilgewebes des Hüftgelenks. Dezellularisiertes Gewebe wird hierbei vereinzelt in der Weichteilrekonstruktion von Muskeln, Sehnen und Bändern nach Traumata eingesetzt. Dieses Gewebe weist eine extrazelluläre Matrix auf, welche eine verbesserte Biointegration und damit einhergehenden guten Heilungsverlauf ermöglicht. Aus diesen Kenntnissen leitete sich die Frage ab, ob der Einsatz von dezellularisierten Geweben auch eine theoretische Möglichkeit für die Weichteilrekonstruktion im Bereich des Hüftgelenks darstellen könnte. Dazu wurden in

dieser Arbeit zum einen die passiv-mechanischen Eigenschaften der Hüftkapselbänder untersucht und zum anderen der Einfluss der Dezellularisierung auf das mechanische Verhalten von porcinem Gewebe (Dermis, Ureter und Ösophagus) analysiert. In weiteren Untersuchungen ist das Versagensverhalten einer muskulären Anbindung nach tumorendoprothetischer Versorgung mit der nativen Anbindung verglichen worden. Für die Analysen mittels uniaxialem Zugversuch ist ein Prüfprotokoll weiterentwickelt und adaptiert worden, um einen standardisierten Ablauf für die biomechanische Testung und die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

Die Gegenüberstellung der Ergebnisse aus den Untersuchungen der Hüftkapselbänder und der dezellularisierten Gewebe zeigte eine höhere Zugfestigkeit sowie ein höheres E-Modul für die dezellularisierten Hohlorgane. Diese Resultate würden zunächst für den Einsatz in der Weichteilrekonstruktion sprechen, allerdings ist die Dehnung nach der Dezellularisierung geringer. Eine alternative Anwendung der dezellularisierten Hohlorgane ergibt sich aus der Ähnlichkeit zum Trevira®-Anbindungsschlauch. Durch die Schlauchform der Hohlorgane können diese wie der Anbindungsschlauch über die Tumorendoprothese gestülpt werden, so dass das native Gewebe des Patienten nach Refixation leichter anwachsen kann. Es ist jedoch zu beachten, dass die Durchmesser der Hohlorgane im Vergleich zum Hüftkopfdurchmesser und zur Tumorendoprothese geringere Abmaße aufweisen. Deshalb muss nach einem alternativen Gewebe gesucht werden, welches nicht nur eine ausreichende Größe, sondern auch die mechanischen Eigenschaften aufweist. Ist ein solches Alternativmaterial ermittelt worden, müssen weiterhin Untersuchungen bzgl. der Handhabung sowie der Toxizität durchgeführt werden.

Zusammenfassend und basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit kommen die dezellularisierten Gewebe aufgrund ihrer mechanischen Eigenschaften für den Einsatz in der Weichteilrekonstruktion des Hüftgelenks aus biomechanischer Sicht in Frage. Sie eröffnen die Möglichkeit, die Versorgung von Hochrisikopatienten zu verbessern und diese schneller zu mobilisieren. Um die Beurteilung vollends abzuschließen, sind weitere Untersuchungen alternativer Gewebe notwendig. Diese betreffen nicht nur den Vergleich der mechanischen Eigenschaften, sondern auch die Biokompatibilität bei der Verwendung in der Weichteilrekonstruktion.

6 Literaturverzeichnis

1. Bergmann G, Deuretzbacher G, Heller M, Graichen F, Rohlmann A et al. (2001) Hip contact forces and gait patterns from routine activities. *Journal of biomechanics* 34: 859–871.
2. Bergmann G, Graichen F, Rohlmann A (1993) Hip joint loading during walking and running, measured in two patients. *Journal of biomechanics* 26: 969–990.
3. Damm P, Kutzner I, Bergmann G, Rohlmann A, Schmidt H (2017) Comparison of in vivo measured loads in knee, hip and spinal implants during level walking. *Journal of biomechanics* 51: 128–132.
4. Learmonth ID, Young C, Rorabeck C (2007) The operation of the century. Total hip replacement. *The Lancet* 370: 1508–1519.
5. Statistisches Bundesamt, editor (2015) Fallpauschalenbezogene Krankenhausstatistik (DRG-Statistik). Diagnosen, Prozeduren, Fallpauschalen und Case Mix der vollstationären Patientinnen und Patienten in Krankenhäusern. Wiesbaden.
6. Eisenmenger M, Pöttsch O, Sommer B (2006) 11. koordinierte Bevölkerungsvorausberechnung–Annahmen und Ergebnisse. Wiesbaden: Statistisches Bundesamt.
7. Sanchez-Sotelo J, Berry DJ (2001) Epidemiology of instability after total hip replacement. *The Orthopedic clinics of North America* 32: 543–552.
8. Phillips CB, Barrett JA, Losina E, Mahomed NN, Lingard EA et al. (2003) Incidence Rates of Dislocation, Pulmonary Embolism, and Deep Infection During the First Six Months After Elective Total Hip Replacement. *The Journal of bone and joint surgery*: 20–26.
9. Hummel MT, Malkani AL, Yakkanti MR, Baker DL (2009) Decreased dislocation after revision total hip arthroplasty using larger femoral head size and posterior capsular repair. *The Journal of arthroplasty* 24: 73–76.
10. Garellick G, Kärrholm J, Lindahl H, Malchau H, Rogmark C et al. (2013) Swedish National Hip Arthroplasty Register 2013. Annual Report.
11. Sadoghi P, Liebensteiner M, Agreiter M, Leithner A, Böhler N et al. (2013) Revision surgery after total joint arthroplasty: a complication-based analysis using worldwide arthroplasty registers. *The Journal of arthroplasty* 28: 1329–1332.
12. Bozic KJ, Rubash HE (2004) The painful total hip replacement. *Clinical orthopaedics and related research* 420: 18–25.
13. Sculco TP (2004) Minimally invasive total hip arthroplasty. *The Journal of arthroplasty* 19: 78–80.

14. Waldman BJ (2003) Advancements in minimally invasive total hip arthroplasty. *Orthopedics* 26: S833-S836.
15. Wenz JF, Gurkan I, Jibodh SR (2002) Mini-incision total hip arthroplasty. A comparative assessment of perioperative outcomes. *Orthopedics* 25: 1031–1043.
16. Prietzel T, Hammer N, Schleifenbaum S, Adler D, Pretzsch M et al. (2014) The Impact of Capsular Repair on the Dislocation Rate after Primary Total Hip Arthroplasty: A Retrospective Analysis of 1972 Cases. *Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie* 152: 130–143.
17. Pellicci PM, Bostrom M, Poss R (1998) Posterior Approach to Total Hip Replacement Using Enhanced Posterior Soft Tissue Repair. *Clinical orthopaedics and related research* 355: 224–228.
18. Goldstein WM, Gleason TF, Kopplin M, Branson JJ (2001) Prevalence of dislocation after total hip arthroplasty through a posterolateral approach with partial capsulotomy and capsulorrhaphy. *The Journal of bone and joint surgery* 83: 2-7.
19. White RE, Forness TJ, Allman JK, Junick DW (2001) Effect of Posterior Capsular Repair on Early Dislocation in Primary Total Hip Replacement. *Clinical orthopaedics and related research* 393: 163–167.
20. Bottner F, Pellicci PM (2006) Review: posterior soft tissue repair in primary total hip arthroplasty. *HSS journal* 2: 7–11.
21. Gosheger G, Hillmann A, Lindner N, Rödl R, Hoffmann C et al. (2001) Soft tissue reconstruction of megaprotheses using a trevira tube. *Clinical orthopaedics and related research* 393: 264–271.
22. Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF (2006) Decellularization of tissues and organs. *Biomaterials* 27: 3675–3683.
23. Chen J, Xu J, Wang A, Zheng M (2009) Scaffolds for tendon and ligament repair. Review of the efficacy of commercial products. *Expert review of medical devices* 6: 61–73.
24. Adams JE, Zobitz ME, Reach JS, An K-N, Steinmann SP (2006) Rotator cuff repair using an acellular dermal matrix graft. An in vivo study in a canine model. *The Journal of Arthroscopic & Related Surgery* 22: 700–709.
25. Lee DK (2008) A preliminary study on the effects of acellular tissue graft augmentation in acute Achilles tendon ruptures. *The Journal of Foot and Ankle Surgery* 47: 8–12.
26. Barber FA, Aziz-Jacobo J (2009) Biomechanical testing of commercially available soft-tissue augmentation materials. *The Journal of Arthroscopic & Related Surgery* 25: 1233–1239.

27. Ellis CV, Kulber DA (2012) Acellular dermal matrices in hand reconstruction. *Plastic and reconstructive surgery* 130: 256S-269S.
28. Rao BM, Kamal TT, Vafaye J, Taylor L (2012) Surgical repair of hip abductors. A new technique using Graft Jacket® allograft acellular human dermal matrix. *International orthopaedics* 36: 2049–2053.
29. Lovati AB, Bottagisio M, Moretti M (2016) Decellularized and engineered tendons as biological substitutes. A critical review. *Stem cells international* 2016.
30. Skedros JG, Henrie TR (2017) Latissimus Dorsi Tendon Transfer with GraftJacket® Augmentation to Increase Tendon Length for an Irreparable Rotator Cuff Tear. *Case reports in orthopedics* 2017.
31. Rieu C, Picaut L, Mosser G, Trichet L (2017) From tendon injury to collagen-based tendon regeneration. Overview and recent advances. *Current pharmaceutical design* 23: 3483–3506.
32. Koch H, Graneist C, Emmrich F, Till H, Metzger R et al. (2012) Xenogenic esophagus scaffolds fixed with several agents. Comparative in vivo study of rejection and inflammation. *BioMed Research International* 2012.
33. Koch H, Hammer N, Ossmann S, Schierle K, Sack U et al. (2015) Tissue engineering of ureteral grafts. Preparation of biocompatible crosslinked ureteral scaffolds of porcine origin. *Frontiers in bioengineering and biotechnology* 3.
34. Wainwright D, Madden M, Luterman A, Hunt J, Monafo W et al. (1996) Clinical evaluation of an acellular allograft dermal matrix in full-thickness burns. *Journal of Burn Care & Research* 17: 124–136.
35. Rovak JM, Bishop DK, Boxer LK, Wood SC, Mungara AK et al. (2005) Peripheral nerve transplantation. The role of chemical acellularization in eliminating allograft antigenicity. *Journal of reconstructive microsurgery* 21: 207–213.
36. Chung S, Hazen A, Levine JP, Baux G, Olivier WA et al. (2003) Vascularized acellular dermal matrix island flaps for the repair of abdominal muscle defects. *Plastic and reconstructive surgery* 111: 225–232.
37. Hülsmann J, Grün K, El Amouri S, Barth M, Hornung K et al. (2012) Transplantation material bovine pericardium. Biomechanical and immunogenic characteristics after decellularization vs. glutaraldehyde-fixing. *Xenotransplantation* 19: 286–297.
38. Byrom MJ, Ng MKC, Bannon PG (2013) Biomechanics and biocompatibility of the perfect conduit—can we build one? *Annals of cardiothoracic surgery* 2: 435.
39. Schmid C (1875) Über die Form und Mechanik des Hüftgelenkes. *Deutsche Zeitschrift für Chirurgie* 5: 1.
40. Fick R (1910) *Handbuch der Anatomie und Mechanik der Gelenke. Part 2: Allgemeine Gelenk- und Muskelmechanik.* Jena: Fischer. 45-62 p.

41. Frick H, Leonhardt H, Starck D (1980) Taschenlehrbuch der gesamten Anatomie. Allgemeine Anatomie/Spezielle Anatomie I. Stuttgart: Georg Thieme.
42. Waldeyer A, Mayet A (1987) 1. Allgemeine Anatomie, Rücken, Bauch, Becken, Bein. - 1987. - XIX, 493 S. Berlin [u.a.]: De Gruyter.
43. Bertolini R (1995) Systematische Anatomie des Menschen ; 45 Tabellen. Berlin [u.a.]: Ullstein Mosby.
44. Bommas-Ebert U, Teubner P, Voss R, Krahn V (2006) Kurzlehrbuch Anatomie und Embryologie. Stuttgart: Georg Thieme.
45. Weber E, Weber W (1837) Über die Mechanik der menschlichen Gehwerkzeuge nebst der Beschreibung eines Versuches über das Herausfallen des Schenkelkopfes im luftverdünnten Raume. Annalen der Physik 40: 1–13.
46. Weber W, Weber E (1836) Mechanik der menschlichen Gehwerkzeuge. Göttingen: Dieterichsche Buchhandlung.
47. Kopsch F, Rauber AA (1955) Rauber-Kopsch Lehrbuch und Atlas der Anatomie des Menschen. Stuttgart: Thieme.
48. Moss SG, Schweitzer ME, Jacobson JA, Brossmann J, Lombardi JV et al. (1998) Hip joint fluid: detection and distribution at MR imaging and US with cadaveric correlation. Radiology 208: 43–48.
49. Schiebler TH, Korf H-W (2005) Anatomie. Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie. Heidelberg: Springer.
50. Faller A (2004) Der Körper des Menschen–Einführung in Bau und Funktion 14. Stuttgart: Georg Thieme.
51. Prietzel T (2014) Die hüftstabilisierende Wirkung des atmosphärischen Druckes und resultierende Konsequenzen für die Luxationsprophylaxe nach Hüftendoprothetik. Experimentelle und klinische Untersuchungen. Leipzig: Habilitationsschrift.
52. Prietzel T, Richter K-W, Pilz D, Salis-Soglio G von (2007) The Stabilizing Effect of Atmospheric Pressure (AP) on Hip Joint Subject to Traction Force – An Experimental Study. Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie 145: 468–475.
53. Prietzel T, Hammer N, Schleifenbaum S, Kassebaum E, Farag M et al. (2014) On the permanent hip-stabilizing effect of atmospheric pressure. Journal of biomechanics 47: 2660–2665.
54. Smith MV, Costic RS, Allaire R, Schilling PL, Sekiya JK (2014) A biomechanical analysis of the soft tissue and osseous constraints of the hip joint. Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy 22: 946–952.
55. Zajonz D, Philipp H, Schleifenbaum S, Möbius R, Hammer N et al. (2015) Größere Köpfe kompensieren erhöhte Hüft-TEP-Luxationsgefahr bei Hochrisikopatienten. Der Orthopäde 44: 381–391.

56. Winkelmann W (1999) Extremitätenerhalt bei malignen Knochentumoren. Deutsches Ärzteblatt 96: 19.
57. Hillmann A, Hoffmann C, Gosheger G, Rödl R, Winkelmann W et al. (2003) Tumors of the pelvis. Complications after reconstruction. Archives of orthopaedic and trauma surgery 123: 340–344.
58. Lewinnek GE, Lewis JL, Richard T, Compere CL, Zimmerman JR (1978) Dislocations after Total Hip Replacement Arthroplasties. The Journal of bone and joint surgery: 217–220.
59. Woo RYG, Morrey BF (1982) Dislocations after Total Hip Arthroplasty. The Journal of bone and joint surgery Vol. 64-A, No. 9 December: 1295–1306.
60. Iorio R, Specht LM, Healy WL, Tilzey JF, Presutti AH (2006) The effect of EPSTR and minimal incision surgery on dislocation after THA. Clinical orthopaedics and related research 447: 39–42.
61. Schulze-Tanzil G, Al-Sadi O, Ertel W, Lohan A (2012) Decellularized tendon extracellular matrix—a valuable approach for tendon reconstruction? Cells 1: 1010–1028.
62. Monteiro GA, Rodriguez NL, Delossantos AI, Wagner CT (2013) Short-term in vivo biological and mechanical remodeling of porcine acellular dermal matrices. Journal of tissue engineering 4.
63. Badylak SF, Gilbert TW, editors (2008) Immune response to biologic scaffold materials: Elsevier. 109-116 p.
64. Cheng CW, Solorio LD, Alsberg E (2014) Decellularized tissue and cell-derived extracellular matrices as scaffolds for orthopaedic tissue engineering. Biotechnology advances 32: 462–484.
65. Aurora A, McCarron J, Iannotti JP, Derwin K (2007) Commercially available extracellular matrix materials for rotator cuff repairs. State of the art and future trends. Journal of shoulder and elbow surgery 16: S171-S178.
66. Gögele C, Schwarz S, Ondruschka B, Hammer N, Schulze-Tanzil G, editors (2017) Decellularized Iliotibial Band Recolonized with Allogenic Homotopic Fibroblasts or Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells. New York: Springer.
67. Steinke H, Lingslebe U, Böhme J, Slowik V, Shim V et al. (2012) Deformation behavior of the iliotibial tract under different states of fixation. Medical Engineering & Physics 34: 1221–1227.
68. Hammer N, Lingslebe U, Aust G, Milani TL, Hädrich C et al. (2012) Ultimate stress and age-dependent deformation characteristics of the iliotibial tract. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials 16: 81–86.

69. Hammer N, Huster D, Fritsch S, Hädrich C, Koch H et al. (2014) Do cells contribute to tendon and ligament biomechanics? PLoS One 9: e105037.
70. Zernia G, Huster D (2006) Collagen dynamics in articular cartilage under osmotic pressure. NMR in Biomedicine 19: 1010–1019.
71. Parsegian VA, Rand RP, Rau DC (1995) [3] Macromolecules and water. Probing with osmotic stress. Methods in enzymology 259: 43–94.
72. Deutsches Institut für Normung e.V. (2009) Prüfung metallischer Werkstoffe (DIN 50125 77.040.10). Berlin.: Beuth.
73. Quinn KP, Winkelstein BA (2011) Preconditioning is correlated with altered collagen fiber alignment in ligament. Journal of biomechanical engineering 133: 64506.
74. Fung Y-c, editor (2010) Biomechanics. Mechanical properties of living tissues. New York: Springer.
75. Cheng S, Clarke EC, Bilston LE (2009) The effects of preconditioning strain on measured tissue properties. Journal of biomechanics 42: 1360–1362.
76. Betsch DF, Baer E (1980) Structure and mechanical properties of rat tail tendon. Biorheology 17: 83–94.
77. Sichtung F, Steinke H, Wagner MF-X, Fritsch S, Hädrich C et al. (2015) Quantification of material slippage in the iliotibial tract when applying the partial plastination clamping technique. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials 49: 112–117.
78. Carew EO, Barber JE, Vesely I (2000) Role of preconditioning and recovery time in repeated testing of aortic valve tissues. Validation through quasilinear viscoelastic theory. Annals of biomedical engineering 28: 1093–1100.
79. Arnold G (1974) Biomechanische und rheologische Eigenschaften menschlicher Sehnen. Anatomy and Embryology 143: 263–300.
80. Nyman JS, Roy A, Shen X, Acuna RL, Tyler JH et al. (2006) The influence of water removal on the strength and toughness of cortical bone. Journal of biomechanics 39: 931–938.
81. Kemper AR, Santago AC, Stitzel JD, Sparks JL, Duma SM (2012) Biomechanical response of human spleen in tensile loading. Journal of biomechanics 45: 348–355.
82. Nicolle S, Palierne J-F (2010) Dehydration effect on the mechanical behaviour of biological soft tissues. Observations on kidney tissues. Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials 3: 630–635.
83. Miller K, Chinzei K (2002) Mechanical properties of brain tissue in tension. Journal of biomechanics 35: 483–490.

84. Song L, Olsen RE, Spalazzi JP, Davisson T (2010) Biomechanical evaluation of acellular collagen matrix augmented Achilles tendon repair in sheep. *The Journal of Foot and Ankle Surgery* 49: 438–441.
85. Farshad M, Barbezat M, Flüeler P, Schmidlin F, Graber P et al. (1999) Material characterization of the pig kidney in relation with the biomechanical analysis of renal trauma. *Journal of biomechanics* 32: 417–425.
86. Brunon A, Bruyere-Garnier K, Coret M (2010) Mechanical characterization of liver capsule through uniaxial quasi-static tensile tests until failure. *Journal of biomechanics* 43: 2221–2227.
87. Hollenstein M, Nava A, Valtorta D, Snedeker J, Mazza E (2006) Mechanical characterization of the liver capsule and parenchyma. *Biomedical Simulation*: 150–158.
88. Wren TAL, Yerby SA, Beaupré GS, Carter DR (2001) Influence of bone mineral density, age, and strain rate on the failure mode of human Achilles tendons. *Clinical Biomechanics* 16: 529–534.
89. Lionello G, Sirieix C, Baleani M (2014) An effective procedure to create a speckle pattern on biological soft tissue for digital image correlation measurements. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 39: 1–8.
90. Mallett KF, Arruda EM (2017) Digital image correlation-aided mechanical characterization of the anteromedial and posterolateral bundles of the anterior cruciate ligament. *Acta Biomaterialia* 56: 44–57.
91. Wang Y, Liu H, Gao L, Xu B, Zhang C (2011) Test the mechanical properties of articular cartilage using digital image correlation technology. *Procedia Environmental Sciences* 8: 191–196.
92. Haen TX, Roux A, Soubeyrand M, Laporte S (2017) Shear waves elastography for assessment of human Achilles tendon's biomechanical properties. An experimental study. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 69: 178–184.
93. Annaidh AN, Bruyère K, Destrade M, Gilchrist MD, Otténio M (2012) Characterization of the anisotropic mechanical properties of excised human skin. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 5: 139–148.
94. Pridgen BC, Woon CYL, Kim M, Thorfinn J, Lindsey D et al. (2011) Flexor tendon tissue engineering. Acellularization of human flexor tendons with preservation of biomechanical properties and biocompatibility. *Tissue Engineering Part C: Methods* 17: 819–828.
95. Vanags I, Petersons A, Ose V, Ozolanta I, Kasyanov V et al. (2003) Biomechanical properties of oesophagus wall under loading. *Journal of biomechanics* 36: 1387–1390.

96. Zeng Y-j, Liu Y-h, Xu C-q, Xu X-h, Xu H et al. (2004) Biomechanical properties of skin in vitro for different expansion methods. *Clinical Biomechanics* 19: 853–857.
97. Salomon F-V, Geyer H, Gille U (2005) *Anatomie für die Tiermedizin*. Stuttgart: Enke-Verlag in MVS Medizinverl.
98. Nickel R, Schummer A, Seiferle E (2004) *Eingeweide. Lehrbuch der anatomie der Haustiere 2*. Stuttgart: Georg Thieme.
99. Milner GR, Boldsen JL (2012) Humeral and femoral head diameters in recent white American skeletons. *Journal of forensic sciences* 57: 35–40.
100. Ewerbeck V, Wentzensen A, Grützner PA, Holz F, Krämer K-L (2014) *Standardverfahren in der operativen Orthopädie und Unfallchirurgie*. Stuttgart [u.a.]: Georg Thieme.
101. Svensson O, Sköld S, Blomgren G (1990) Integrity of the gluteus medius after the transgluteal approach in total hip arthroplasty. *The Journal of arthroplasty* 5: 57–60.
102. Baker AS, Bitounis VC (1989) Abductor function after total hip replacement. An electromyographic and clinical review. *The Journal of bone and joint surgery* 71: 47–50.
103. Bauer R, Kerschbaumer F, Poisel S, Oberthaler W (1979) The Transgluteal Approach to the Hip Joint. *Archives of orthopaedic and trauma surgery* 95: 47–49.
104. Harges J, Ahrens H, Nottrott M, Dieckmann R, Gosheger G et al. (2012) Der Anbindungsschlauch zur Weichteilrekonstruktion nach Megaprothesenimplantation. *Operative Orthopädie und Traumatologie* 24: 227–234.
105. Gottsauner-Wolf F, Grabowski JJ, Chao E, An K (1995) Effects of freeze/thaw conditioning on the tensile properties and failure mode of bone-muscle-bone units. A biomechanical and histological study in dogs. *Journal of orthopaedic research* 13: 90–95.

IV. Darstellung des eigenen Beitrags

Nachfolgend erfolgt per Unterschrift durch den Promovenden, Herrn Stefan Schleifenbaum, sowie durch den korrespondierenden Mitautor, Herrn Prof. Dr. med. habil. Niels Hammer, und mindestens der Hälfte der Autoren die Bestätigung der ausgeführten inhaltlichen Spezifizierung des jeweilig geleisteten Beitrags zur Erstellung und Abfassung der Publikationsschriften.

Tensile properties of the hip joint ligaments are largely variable and age-dependent – An in-vitro analysis investigating an age span between 14 and 93 years

S. Schleifenbaum¹, T. Prietzel¹, C. Hädrich, R. Möbius, F. Sichting, N. Hammer

¹ These authors have contributed equally to this work.

Journal of Biomechanics 2016

DOI 10.1016/j.biomech.2016.09.001

Inhaltlich geleisteter Beitrag für den oben genannten Artikel des Promovenden, Herrn Stefan Schleifenbaum: Datenerhebung der Materialkenndaten, Literaturrecherche, Auswertung der Daten, Diskussion, Verfassung des Manuskripts, Grafik



Prof. Dr. Niels Hammer



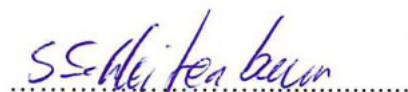
PD Dr. Torsten Prietzel



Dr. Carsten Babian
(ehemals Hädrich)



Robert Möbius



Stefan Schleifenbaum

Load and failure behavior of human muscle samples in the context of proximal femur replacement

S.Schleifenbaum¹, M.Schmidt¹, R. Möbius, T. Wolskämpf, C. Schröder, R.Grunert, N. Hammer, T. Prietzel

¹ These authors have contributed equally to this work.

BMC Musculoskeletal Disorders 2016

DOI 10.1186/s12891-016-0998-7

Inhaltlich geleisteter Beitrag für den oben genannten Artikel des Promovenden, Herrn Stefan Schleifenbaum: Datenerhebung der Materialkenndaten, Literaturrecherche, Auswertung der Daten, Diskussion, Verfassung des Manuskripts, Grafik



Prof. Dr. Niels Hammer



Michael Schmidt



Robert Möbius



Dr. Ronny Grunert



PD Dr. Torsten Prietzel



Stefan Schleifenbaum

Acellularization-Induced Changes in Tensile Properties Are Organ Specific - An In-Vitro Mechanical and Structural Analysis of Porcine Soft Tissues

S. Schleifenbaum¹, T. Prietzel¹, G. Aust, A. Boldt, S. Fritsch, I. Keil, H. Koch, R. Möbius, H. A. Scheidt, M. F. X. Wagner, N. Hammer

¹ These authors have contributed equally to this work.

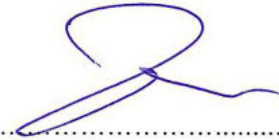
PloS One 2016

DOI:10.1371/journal.pone.0151223

Inhaltlich geleisteter Beitrag für den oben genannten Artikel des Promovenden, Herrn Stefan Schleifenbaum: Datenerhebung der Materialkenndaten, Literaturrecherche, Auswertung der Daten, Diskussion, Verfassung des Manuskripts, Grafik



Prof. Dr. Niels Hammer



PD Dr. Torsten Prietzel



Prof. Dr. Gabriele Aust



Dr. Andreas Boldt



Robert Möbius



PD Dr. Holger Scheidt



Stefan Schleifenbaum

V. Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar eine Vergütung oder geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Zudem beglaube ich, dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Die aktuellen gesetzlichen Vorgaben in Bezug auf die Zulassung der klinischen Studien, die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes, die Bestimmungen des Gentechnikgesetzes und die allgemeinen Datenschutzbestimmungen wurden eingehalten. Ich versichere, dass ich die Regelungen der Satzung der Universität Leipzig zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis kenne und eingehalten habe.

.....

Datum

.....

Unterschrift

VI. Lebenslauf und wissenschaftlicher Werdegang

Personalien

Name, Vorname	Schleifenbaum, Stefan
Geburtsdatum	07. Dezember 1986
Geburtsort	Ahlen, Nordrhein-Westfalen, Deutschland
Familienstand	ledig, keine Kinder

Schulbildung

1990-1993	Albert-Schweizer-Grundschule Ahlen
1993 –2006	Städt. Gymnasium Ahlen

Universitätsausbildung

10/2006 - 10/2009	Bachelorstudium mit der Fachrichtung Sports Engineering an der Technischen Universität Chemnitz
10/2009 – 11/2012	Masterstudium mit der Fachrichtung Sports Engineering an der Technischen Universität Chemnitz
Seit 07/2015	Promotion an der Klinik und Poliklinik für Orthopädie, Unfallchirurgie und plastische Chirurgie der Universität Leipzig

Beruflicher Werdegang

Seit 01/2013	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Forschungslabor der Klinik und Poliklinik für Orthopädie, Unfallchirurgie und plastische Chirurgie der Universität Leipzig
12.02.2016- 29.02.2016	Forschungs- und Lehrtätigkeit an der Universität von Otago, Neuseeland

Wissenschaftlicher Werdegang

Beantragte Projekte:

Begutachtete Projekte:

1	ZIM-Projekt 920000-176 VeRoAdapt	01.07.2016-30.06.2018	157.843 Euro
---	-------------------------------------	-----------------------	--------------

Betreute Bachelorarbeiten

Schuster, B.; Entwicklung eines Versuchsaufbaus für einen standardisierten Ausrissversuch einer Anbindung an einem Zentralen Venenkatheter; Bachelorarbeit; Technische Universität Chemnitz (Deutschland)

Vorträge:

Technische Universität Chemnitz 2017

Eine Vorlesung im Rahmen der Ringvorlesung:

Titel: Mechanische Prüfung an biologischen Geweben -Probleme und Chancen-

Deutsche Gesellschaft für Biomechanik 2017

Vortrag im Rahmen des Kongresses der Deutsche Gesellschaft für Biomechanik

Titel: Biomechanische Vergleichstestung von Doppelplattenosteosynthese vs. Goldstandard bei instabilen Frakturen am proximalen Humerus

S. Schleifenbaum, J. Theopold, M. Müller, N. Hammer, M. Werner, P. Hepp

University of Otago Neuseeland 2016

Vortrag im Rahmen des Neuseeland Aufenthaltes:

Titel: Potentials and limits of mechanical testing as a tool for investigating biological tissues

Technische Universität Chemnitz 2016

Eine Vorlesung im Rahmen der Ringvorlesung:

Titel: Mechanische Prüfung an biologischen Geweben -Probleme und Chancen-

Vortrag auf der Buchmesse Leipzig 2015

Vortrag im Rahmen des Messestandes der Universität Leipzig

Titel: Neue Wege in der Gelenk-Endoprothetik

Publikationen

als Erst- oder gleichrangiger Erstautor

2016

Möbius, R.; **Schleifenbaum, S.**; Grunert, R.; Löffler, S.; Werner, M.; Prietzel, T.; Hammer, N.; A pilot trial comparing the tear-out behavior in screw-sockets and cemented polyethylene acetabular components - a cadaveric study, in: Orthopaedics & traumatology, surgery & research: OTSR, 102, 2016.

Schleifenbaum, S.; Prietzel, T.; Aust, G.; Boldt, A.; Fritsch, S.; Keil, I.; Koch, H.; Möbius, R.; Scheidt, H. A.; Wagner, Martin F X; Hammer, N.; Acellularization-Induced Changes in Tensile Properties Are Organ Specific - An In-Vitro Mechanical and Structural Analysis of Porcine Soft Tissues, in: PloS one, 11, 2016.

Schleifenbaum, S.; Prietzel, T.; Haedrich, C.; Möbius, R.; Sichtung, F.; Hammer, N.; Tensile properties of the hip joint ligaments are largely variable and age-dependent - An in-vitro analysis in an age range of 14-93 years, in: Journal of Biomechanics, 2016.

Schleifenbaum, S.; Schmidt, M.; Möbius, R.; Wolfskämpf, T.; Schröder, C.; Grunert, R.; Hammer, N.; Prietzel, T.; Load and failure behavior of human muscle samples in the context of proximal femur replacement, in: BMC musculoskeletal disorders, 17, 2016.

Publikationen als Co-Autor

2017

Höch, A.; Schimpf, R.; Hammer, N.; **Schleifenbaum, S.**; Werner, M.; Josten, C.; Böhme, J.; Biomechanical analysis of stiffness and fracture displacement after using PMMA-augmented sacroiliac screw fixation for sacrum fractures, in: Biomedical Engineering/Biomedizinische Technik, 62, 2017.

Grunert, R.; **Schleifenbaum, S.**; Möbius, R.; Sommer, G.; Zajonz, D.; Hammer, N.; Prietzel, T.: Are Higher Prices for Larger Femoral Heads in Total Hip Arthroplasty Justified from the Perspective of Health Care Economics? An Analysis of Costs and Effects in Germany. In: Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie 155, 2017.

2015

Hammer, N.; Glatzner, J.; Feja, C.; Kuhne, C.; Meixensberger, J.; Planitzer, U.; **Schleifenbaum, S.**; Tillmann, B. N.; Winkler, D.; Human vagus nerve branching in the cervical region, in: PloS one, 10, 2015.

Hammer, N.; Hepp, P.; Löffler, S.; **Schleifenbaum, S.**; Steinke, H.; Klima, S.; Teaching surgical exposures to undergraduate medical students: an integration concept for anatomical and surgical education, in: Archives of orthopaedic and trauma surgery, 135, 2015.

Hammer, N.; Möbius, R.; **Schleifenbaum, S.**; Hammer, K.-H.; Klima, S.; Lange, J. S.; Soisson, O.; Winkler, D.; Milani, T. L.; Correction: Pelvic Belt Effects on Health Outcomes and Functional Parameters of Patients with Sacroiliac Joint Pain, in: PloS one, 10, 2015.

Hammer, N.; Möbius, R.; **Schleifenbaum, S.**; Hammer, K.-H.; Klima, S.; Lange, J. S.; Soisson, O.; Winkler, D.; Milani, T. L.; Pelvic Belt Effects on Health Outcomes and Functional Parameters of Patients with Sacroiliac Joint Pain, in: PloS one, 10, 2015.

Zajonz, D.; Philipp, H.; **Schleifenbaum, S.**; Möbius, R.; Hammer, N.; Grunert, R.; Prietzel, T.; Größere Köpfe kompensieren erhöhte Hüft-TEP-Luxationsgefahr bei Hochrisikopatienten, in: Der Orthopäde, 44, 2015.

2014

Prietzl, T.; Hammer, N.; **Schleifenbaum, S.**; Adler, D.; Pretzsch, M.; Kohler, L. et al.; The impact of capsular repair on the dislocation rate after primary total hip arthroplasty: a retrospective analysis of 1972 cases. in: Z Orthop Unfall 152 (2), 2014, S. 130–143.

Prietzl, T.; Hammer, N.; **Schleifenbaum, S.**; Kassebaum, E.; Farag, M.; von Salis-Soglio, G.; On the permanent hip-stabilizing effect of atmospheric pressure. In: Journal of Biomechanics 47, 2014.

Kongress-/Posterbeiträge:

2017

Linear wear of UHMWPE-Liners and incidence of osteolysis differ significantly, if different constructed sockets are used in THA - A retrospective long-term study of 45 cases (2017).

Prietzl, T.; Dubitzki, S.; Zajonz, D.; Sommer, G.; **Schleifenbaum, S.**; Möbius, R.; Hammer, N.; Grunert, R. EFORT 2017. Wien, 31.05.2017

Röntgenbasierte in-vivo-Messung des linearen Polyethylenabriebs nach primärer Hüfttotalendoprothesenimplantation. **Schleifenbaum S.** (Leipzig), Prietzl T., Briesemeister M., Sommer G., Möbius R., Schmidt M., Hammer N., Grunert R. DKOU 2017, Berlin

Einfluss der Weichteilbehandlung auf die Komplikationsrate der Revisionshüftendoprothetik - minderinvasive vs. normalinvasive HTEP-Wechsel. Jurkutat J., Zajonz D., **Schleifenbaum S.**, Sommer G., Hammer N., Roth A., Josten C., Prietzl T. DKOU 2017, Berlin

Der Einfluss der Kapselresektion auf das Luxationsrisiko nach primärer Hüfttotalendoprothesen-Implantation - eine multivariate Analyse von 3031 Fällen. Prietzl T., Lehmann T., Möbius R., **Schleifenbaum S.**, Sommer G., Zajonz D., Hammer N., Grunert R. DKOU 2017, Berlin

2016

Huge Increase In Dislocation Work Is Responsible For Reduced Dislocation Rate Of Larger Heads In Total Hip Arthroplasty (2016). Prietzl, T.; Schmidt, M.; **Schleifenbaum, S.**; Möbius, R.; Wendler, T.; Zajonz, D. et al. (Hg.). EFORT 2016. Genf, 03.06.2016.

Acellularization-induced changes in tensile properties are organ specific (2016) **Schleifenbaum, S.**; Prietzel, T.; Aust, G.; Boldt, A.; Keil, I.; Möbius, R.; Hammer, N. (Hg.). 111th Annual Meeting - Anatomische Gesellschaft. Göttingen.

Verification Of A CT-Free Measuring Method To Determine The Hip Rotation Center And The Leg Length (2016) Schmidt, M.; Prietzel, T.; Wendler, T.; Möbius, R.; **Schleifenbaum, S.**; Hammer, N.; Grunert, R. (Hg.). EFORT 2016. Genf, 02.06.2016.

2015

Biomechanische Testung einer zementierten transiliosakralen Schraubenosteosynthes (Fa. Königsee). (2015) Höch, A.; Schimpf, R.; **Schleifenbaum, S.**; Hammer, N.; Böhme, J.; Werner, M.; Josten, C. (Hg.). DKOU - Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie. Berlin, 20.-23.10.2015.

Der Anstieg der Luxationsarbeit bei Zunahme des Gelenkdurchmessers als Ursache der geringeren Luxationsneigung von Hüftendoprothesen mit großen Köpfen (2015) Prietzel, T.; Schmidt, M.; **Schleifenbaum, S.**; Möbius, R.; Panzert, S.; Philipp, H. et al. (Hg.). Berlin, 20.-23.10.2015.

Der intraartikuläre Absolutdruck als Indikator für die Luxationsstabilität des Hüftgelenkes (2015) Prietzel, T.; **Schleifenbaum, S.**; Hammer, N.; Schmidt, M.; Möbius, R.; Sommer, G.; Grunert, R. (Hg.). 9. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomechanik (DGfB). Bonn, 06.-08.05.2015.

Versagensverhalten humaner Muskelproben im Rahmen tumorendoprothetischer Versorgung des proximalen Femurs (2015) **Schleifenbaum, S.**; Schmidt, M.; Möbius, R.; Hammer, N.; Wolfskämpf, T.; Prietzel, T.; Grunert, R. (Hg.). 9. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomechanik (DGfB). Bonn, 06.-08.05.2015.

Röntgenschatenrissanalyse zur Bestimmung von Inklination und Anteversion zementfreier intransparenter Hüftendoprothesenpfannen: ein Modellversuch mit Vergleich zur CT-basierten Messung (2015) Sommer, G.; Schmidt, M.; Möbius, R.; Treichel, T.; Seiwerts, M.; **Schleifenbaum, S.**; Hammer, N. (Hg.). DKOU - Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie. Berlin, 20.-23.10.2015.

2014

Versagensverhalten humaner Muskelproben im Rahmen tumorendoprothetischer Versorgung des proximalen Femurs (2014) **Schleifenbaum, S.**; Möbius, R.; Schmidt, M.; Hammer, N.; Wolfskämpf, T.; Grunert, R.; Prietzel, T. (Hg.). 13. Leipzig Research Festival for Life Sciences. Leipzig, 18.12.2014.

Röntgenschatenrissanalyse RSRA (2014) Sommer, Gerald; Prietzel, Torsten; **Schleifenbaum, S.**; Schmidt, M.; Möbius, R.; Treichel, T. et al. (Hg.). 13. Leipzig Research Festival for Life Sciences. Leipzig, 18.12.2014.

VII. Danksagung

Mein Dank gilt an erster Stelle meinen Betreuern PD. Dr. med. Torsten Prietzel und Prof. Dr. med. Niels Hammer für ihre uneingeschränkte Unterstützung bei der Entstehung dieser Arbeit. Ich danke für die vielen lehrreichen, wissenschaftlichen und freundschaftlichen Diskussionen sowie Kritiken im Rahmen dieser Arbeit.

Für ihre Unterstützung und Mitarbeit möchte ich mich besonders bei den Mitarbeitern des Labors ZESBO bedanken, die mich stets unterstützt und gestärkt haben. Ein besonderer Dank gilt dabei Michael Schmidt und Robert Möbius, die mir auf dem langen Weg zur Seite standen und mich durch Anmerkungen sowie Diskussionen hilfreich unterstützt haben. Ebenfalls möchte ich mich bei Anna Trauth für die vielen Diskussionen und die Unterstützung im Rahmen eines gemeinschaftlichen wissenschaftlichen Austausches bedanken.

Bei meinen Eltern und Großeltern möchte ich mich für ihre bedingungslose und unbegrenzte Unterstützung in allen Lebenslagen bedanken. Ein besonderer Dank gilt auch meiner Freundin Maren für ihre dauerhafte Unterstützung in jeder Lage und dem motivierenden Antrieb bei der Entstehung dieser Arbeit.

Mein größter Respekt und Dank gebührt den Körperspendern.